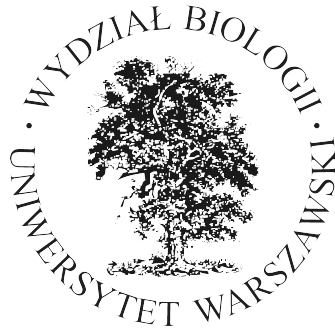


Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii



Aleksandra Bukowska
Nr albumu: 220414

Zastosowanie analizy genów markerowych do badań zakwitów toksycznych cyjanobakterii w jeziorach

Rozprawa doktorska
w zakresie nauk biologicznych
dyscyplinie biologia

Praca wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Ryszarda J. Chrósta
promotor pomocniczy dr hab. Iwona Jasser
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, luty 2017

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Słowa kluczowe

biodegradacja toksyn, cyjanobakterie, cyjanotoksyny, DGGE, *Microcystis*, mikrocystyny, *Planktothrix*, qPCR, toksyczne zakwity

Tytuł pracy w języku angielskim

Application of marker genes analysis for the study of toxic cyanobacterial blooms in lakes

Streszczenie

Zakwity cyjanobakterii stanowią poważny problem w ekosystemach wodnych, ponieważ najczęściej są powodem spadku różnorodności biologicznej fitoplanktonu i innych wodnych organizmów. Powodują zmniejszenie przezroczystości wody doprowadzając do powstawania stref beztlenowych w głębszych partiach wód i osadach dennych, a ich masowa obecność skutkuje obniżeniem walorów gospodarczych i rekreacyjnych zbiornika wodnego. Dodatkowo zakwitom sinic często towarzyszy obecność uwalnianych z ich komórek toksyn, spośród których hepatotoksyczne mikrocystyny stanowią najczęstsze zagrożenie w ekosystemach słodkowodnych. Cyjanotoksyny mogą być groźne zarówno dla organizmów wodnych, jak i zwierząt lądowych oraz człowieka. Problemy zdrowotne, w tym również śmiertelne zatrucia, może powodować spożycie skażonej wody, ale także kontakt z nią np. podczas rekreacji. Najważniejszymi czynnikami promującymi powstawanie zakwitów sinic są eutrofizacja i podwyższona temperatura wody. W ich konsekwencji zakwity stają się częstsze, mogą trwać dłużej oraz być bardziej toksyczne. Tak więc prognozowane dalsze ocieplanie się klimatu może sprawić, że zakwity cyjanobakterii będą stawały się coraz ważniejszym globalnym problemem.

System Wielkich Jezior Mazurskich to zespół jezior, zlokalizowany w północno-wschodniej części Polski. W jego skład wchodzi największe polskie jeziora, ponadto jest to obszar niezwykle cenny pod względem przyrodniczym i turystycznym, jak również ważny z punktu widzenia lokalnej gospodarki. W jeziorach mazurskich występuje duża różnorodność taksonomiczna cyjanobakterii, zwykle również to one dominują w okresie letnim w całkowitej biomacie fitoplanktonu. Jeziora należące do systemu różnią się znacznie między sobą pod względem statusu troficznego, pomimo, że wszystkie są połączone w sposób naturalny lub sztucznymi kanałami. Sprawia to, że system WJM stanowi znakomity model do badania wpływu różnych czynników biologicznych i fizykochemicznych na zespoły cyjanobakterii.

Celem niniejszej pracy była kompleksowa analiza, z zastosowaniem metod biologii molekularnej, różnorodności zespołów cyjanobakterii, w tym cyjanobakterii potencjalnie toksycznych, w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich. Celem było także określenie czynników środowiskowych, które mogą wpływać na występowanie i różnorodność zespołów sinic w badanych jeziorach. Ważnym aspektem pracy było zbadanie, czy na podstawie udziału toksycznych genotypów w populacjach możliwe jest

przewidywanie występowania toksycznego zakwitu we wczesnej fazie sezonu wegetacyjnego. Dla pełnego obrazu zależności środowiskowych związanych toksycznymi zakwitami, badano również, czy mikrocyistyny w badanych środowiskach mogą podlegać degradacji przez naturalne zespoły bakterii.

Przeprowadzono analizę porównawczą dwóch metod badania składu taksonomicznego cyjanobakterii w próbkach wody jeziornej – klasycznej metody mikroskopowej i metody molekularnej, opartej na elektroforezie w gradiencie denaturującym (DGGE) i sekwencjonowaniu DNA. Wykazano, że do pełnej identyfikacji składu taksonomicznego nadal niezbędne jest stosowanie metod mikroskopowych. Metoda molekularna może być jednak stosowana do określenia występowania taksonów dominujących, a jej przewagą jest znacznie krótszy czas uzyskania wyników, zwłaszcza w przypadku konieczności analizy licznych próbek.

Analiza DGGE pozwoliła również na stworzenie profili prążkowych, charakterystycznych dla danej próbki, dzięki którym można było prześledzić zmiany zachodzące w zespołach cyjanobakterii w czasie, oraz określić, jakie czynniki wpływają na podobieństwa i różnice pomiędzy nimi. Wyniki pokazały, że w badanych jeziorach mazurskich najbardziej zróżnicowana struktura taksonomiczna sinic występuje w miesiącach letnich. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na podobieństwo zespołów sinic pomiędzy próbkami z poszczególnych jezior nie jest ich bezpośrednie połączenie albo zbliżony stan troficzny, ale okres, w którym pobierano próbkę do badania. W większości jezior istnieje też podobny potencjał występowania poszczególnych taksonów, a tylko ich aktualna liczebność zależy od panujących warunków środowiskowych. Oznacza to, że nawet jeziora o stosunkowo niskim statusie troficznym, w odpowiednich warunkach środowiska (takich jak np. wysoka temperatura lub nasłonecznienie), mogą być zagrożone zakwitami sinic.

W niniejszej pracy zaproponowano procedurę rozpoznawania toksycznych rodzajów cyjanobakterii w próbkach środowiskowych z zastosowaniem analizy DGGE, w której użyto fragment genu *mcyA* z klastra kodującego enzymy syntetyzujące mikrocyistyny. Wyniki tej analizy wskazują, że pomimo bardzo dużego zróżnicowania struktury taksonomicznej zespołów cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu WJM, jedynie przedstawiciele dwóch rodzajów z nich - *Microcystis* i *Planktothrix* mogą wytwarzać mikrocyistyny. Toksyczne genotypy znajdowano we wszystkich badanych jeziorach, jednak najczęściej wykrywano te należące do *Planktothrix* spp. Prawdopodobne jest, że w czasie trwania badań uchwyciono

moment rozprzestrzeniania się toksycznego *Planktothrix* spp. do mezotroficznego jeziora Mamry, w którym wcześniej nie wykrywano toksycznych genotypów tego taksonu.

Ponieważ doniesienia ostatnich lat wskazują, że do potencjalnie toksycznych cyjanobakterii należą również taksony pikocyjanobakterii, postanowiono sprawdzić, czy wśród szczepów *Synechococcus* spp., wyizolowanych we wcześniejszych latach z jezior mazurskich, znajdują się takie, które posiadają geny odpowiedzialne za wytwarzanie mikrocyzyn. Wykazano, że w jednym ze szczepów, wyizolowanym z jeziora Beldany, obecne są geny z klastra *mcy*. Trzy sekwencje - *mcyA*, *mcyD* i *mcyE*, są pierwszymi znanymi sekwencjami genów *mcy* należącymi do pikocyjanobakterii.

Badania z zastosowaniem real-time PCR pozwoliły na prześledzenie zmian w udziale toksycznych genotypów w całkowitej liczebności populacji *Microcystis* i *Planktothrix* spp. w czasie trwania sezonu wegetacyjnego. Stwierdzono, że średnie całkowite liczebności komórek *Planktothrix* spp. były o rząd wielkości wyższe, niż liczebności komórek *Microcystis* spp. Udział toksycznych genotypów w całkowitej liczebności *Microcystis* spp. był zmienny, ale w większości próbek niski, tylko w trzech z nich przekraczał 30%. Nie zaobserwowano żadnej tendencji, z jaką udział toksycznych komórek *Microcystis* spp. zmieniałby się w okresie sezonu wegetacyjnego. Natomiast w populacjach *Planktothrix* spp., udział toksycznych genotypów był zawsze bardzo wysoki (>75%), choć zaobserwowano też tendencję do nieznacznego zmniejszania się udziału komórek toksycznych w populacji w czasie sezonu. Stwierdzono, że na podstawie udziału toksycznych komórek w całkowitej liczebności *Planktothrix* spp. w próbkach pobieranych wiosną, można prognozować zagrożenie wystąpieniem toksycznego zakwitu w badanym jeziorze w późniejszych miesiącach. Jednak wyniki wskazują też, że przypadki osiągnięcia dużej biomasy przez mazurskie populacje *Planktothrix* spp. zawsze będą wiązały się z ryzykiem pojawienia się mikrocyzyn w wodzie.

Analizując stężenia mikrocyzyn badanych próbkach stwierdzono, że gdy liczebność dwóch potencjalnie toksycznych rodzajów cyjanobakterii osiąga wartość $6,6 \times 10^6$ kom/l, całkowite stężenie mikrocyzyn przekracza graniczne bezpieczne stężenie dla wód wykorzystywanych jako woda pitna (1 µg/l). Wykazano korelację pomiędzy liczebnością toksycznych komórek *Planktothrix* spp. a stężeniem toksyn w próbce. Takich zależności nie znaleziono natomiast w przypadku *Microcystis* spp. Oznacza to, że głównym taksonem cyjanobakterii odpowiedzialnym za wytwarzanie mikrocyzyn w badanych jeziorach mazurskich jest rodzaj *Planktothrix*.

W prezentowanej pracy zbadano też, czy w wybranych jeziorach systemu WJM występują bakterie posiadające geny *mlr* odpowiedzialne za degradację mikrocystyn. Potwierdzono, że w badanych jeziorach występują bakterie mogące rozkładać mikrocystyny, a badania filogenetyczne zaklasyfikowały te bakterie do rodziny *Sphingomonadaceae*, w której wcześniej opisywano taksony posiadające zdolność rozkładu toksyn. Stwierdzono również, że bakterie te w jeziorach mazurskich występują przede wszystkim w osadach dennych, a do wód powierzchniowych mogą rozprzestrzeniać się w sprzyjających warunkach środowiska.

Abstract

Cyanobacterial blooms constitute a serious problem for aquatic ecosystems. They can cause a decline in biodiversity of phytoplankton and other aquatic organisms, decreased water transparency, high consumption of oxygen and formation of anaerobic zones. They can also lead to decrease of economic and recreational value of reservoir. Additionally, cyanobacterial blooms are often accompanied by the presence of toxins released from their cells. Hepatotoxic microcystins are the most common threat to freshwater ecosystems. Cyanotoxins can be dangerous for both aquatic and land animals and also for humans. Health problems, including fatal poisoning, can be caused by consumption of contaminated water, but also by direct contact with water contained microcystins, e.g. during recreation. The most important factors that promote the formation of cyanobacterial blooms are eutrophication and increased water temperature. In consequence blooms are becoming more frequent, last longer and are more toxic. Because of predicted further climate warming, cyanobacterial blooms may become an increasingly important global issue.

The Great Masurian Lakes system (GML) is a complex of lakes, located in the north-eastern Poland. It includes the largest polish lake and this region is extremely valuable in terms of nature, tourism, as well as importance for the local economy. Cyanobacteria usually predominate in the total biomass of phytoplankton; moreover there is a large taxonomic variety of cyanobacteria in the waters of GML. Lakes belonging to the system differ significantly in the trophic status, even though they are all connected naturally or by man-made channels. This makes the GML system an excellent model to study the influence of various physico-chemical and biological factors on the cyanobacteria communities.

The aim of this study was comprehensive analysis, using molecular biology methods, of the diversity of cyanobacteria communities, including potentially toxic cyanobacteria, in selected lakes of the GML system. The other aim was to identify factors that may affect cyanobacteria communities in the studied environments. An important aspect of this work was to investigate whether it is possible to predict the occurrence of toxic blooms in the early stage of the growing season, on the basis of share of toxic genotypes in the population. For a better knowledge of environmental factors influencing cyanobacteria communities the last aim of the study was to determine, whether in GML occurs degradation of microcystins by natural bacteria from lake waters and sediments.

A comparative analysis of two methods of determination the taxonomic composition of cyanobacteria in lake water samples was conducted – one was the classical microscopic method, and second was the molecular method, based on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and DNA sequencing. It has been shown that for complete taxonomic identification is still necessary to use microscopic methods. However, molecular method can be used to determine the presence of dominant taxa. Its advantage is a much shorter time needed for obtaining results, especially in cases of the analysis of multiple samples.

In DGGE analysis also the sample-characteristic gel bands profiles were created, allowing to track changes in cyanobacteria communities in time, and also to determine what factors influence the similarities and differences between them. The results showed that in the studied lakes the most diversified taxonomic structure of cyanobacteria occurs in the summer months. The most important factor influencing the similarity between the cyanobacteria communities was not the direct connection between the lakes or similar trophic state, but the period in which the sample was taken. In most lakes, there is a similar potential for the occurrence of individual taxa, but the actual number depends on the environmental conditions. This means that even lakes with relatively low trophic status may be at risk of cyanobacteria bloom in suitable environmental conditions (such as high temperature or sunlight).

In this dissertation a procedure for identification the potentially toxic cyanobacteria in environmental samples was proposed. This procedure uses DGGE analysis with *mcyA* gene fragment from the cluster encoding microcystin synthesis enzymes. The results indicate that despite the very large diversity in the structure of cyanobacteria in GML, only two genera - *Planktothrix* and *Microcystis* can produce microcystins. Toxic genotypes were found in all studied lakes, but *Planktothrix* spp. was detected much more often than *Microcystis* spp. It is likely that during the course of the study the spread of toxic *Planktothrix* spp. genotypes to mesotrophic lake Mamry was observed.

Reports of recent years indicate that among the potentially toxic cyanobacteria are also picocyanobacteria taxa. In this work the presence of genes responsible for the production of microcystins in the *Synechococcus* spp. strains, isolated from GML, was tested. It has been demonstrated that one of the strains isolated from lake Beldany has in its genome *mcy* gene cluster. Three sequences - *mcyA*, *mcyD* and *mcyE*, are the first known sequences of *mcy* genes belonging to picocyanobacteria.

Real-time PCR analyses allowed tracing the changes in the share of toxic genotypes in the total populations of *Planktothrix* and *Microcystis* spp. during the growing season. It was found that the average total number of *Planktothrix* spp. cells was significantly higher than the number of *Microcystis* spp. cells. Participation of toxic genotypes in the total number of *Microcystis* spp. was variable, but low in most samples, only in three of them exceeded 30%. There was not any trend in changes of the share of toxic cells during the season. On the other hand, in *Planktothrix* spp. populations the proportion of toxic genotypes were always very high (> 75%), however there was a tendency to slight decrease in the share of toxic cells in the population during the vegetation season. It was found that forecasting of toxic bloom on the basis of the participation of toxic cells in the total number of *Planktothrix* spp. in samples taken in spring is possible. However, the results also indicate that biomass increase of masurian populations of *Planktothrix* spp. will always be associated with the occurrence of microcystins in the water.

It was also found that when the abundance of two potentially toxic genera of cyanobacteria is higher than $6,6 \times 10^6$ cells/l, the total concentration of microcystin exceed safe limits for water used as drinking water (1 µg/l). A correlation between the number of toxic *Planktothrix* spp. cells and the concentration of toxin in the sample was found. Such correlation was not found in the case of *Microcystis* spp. This means that the main cyanobacteria taxon responsible for the production of microcystins in the studied Great Masurian Lakes is *Planktothrix* genus.

The presence, in selected GML, of bacteria possessing *mlr* genes, responsible for the degradation of microcystins have also been studied in this work. It was confirmed that in the studied lakes occur bacteria that can decompose microcystins. Phylogenetic analysis have classified these bacteria to the family *Sphingomonadaceae*. In this family previously have been discovered several species with the abilities of toxins degradation. These bacteria in masurian lakes are predominantly found in bottom sediments. Probably they can occur in surface water, to which they are spread from the sediments, in favorable environmental conditions.

Spis treści

STRESZCZENIE	4
ABSTRACT	8
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	14
1. WSTĘP	15
1.1. Zagrożenia środowisk wodnych związane z eutrofizacją	15
1.2. Zakwity cyjanobakterii jako jeden ze skutków hypereutrofizacji	18
1.3. Toksyny wytwarzane przez cyjanobakterie	23
1.3.1. Hepatotoksyny	26
1.3.1.1. Cykliczne peptydy	26
1.3.1.1.1. Taksony wytwarzające mikrocytyny i nodularyny	26
1.3.1.1.2. Budowa cząsteczkowa toksyn	27
1.3.1.1.3. Właściwości i toksyczność	27
1.3.1.1.4. Genetyczne podstawy toksyczności	28
1.3.1.1.5. Udział toksycznych genotypów w populacji	29
1.3.1.1.6. Czynniki środowiskowe wpływające na wytwarzanie mikrocytyn	30
1.3.1.2. Alkaloidy	31
1.3.2. Neurotoksyny	31
1.3.2.1. Alkaloidy - anatoksyna-a, anatoksyna-a(S) i saksitoksyna	31
1.3.2.2. Niebiałkowy aminokwas – BMAA	32
1.3.3. Dermatotoksyny	33
1.3.3.1. Alkaloidy	33
1.3.3.2. Lipopolisacharyd	34
1.3.4. Inne metabolity cyjanobakterii	34
1.3.5. Zatrucia cyjanotoksynami u ludzi i zwierząt	34
1.4. Degradacja mikrocytyn w środowiskach naturalnych	36
1.5. Metody biologii molekularnej w badaniach cyjanobakterii w środowiskach naturalnych	39
2. CELE BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE	43
2.1. Testowane hipotezy badawcze	43
2.2. Szczegółowe cele badań	43
3. TEREN BADAŃ	44
4. MATERIAŁY I METODY	48
4.1. Pobór próbek do analiz	48
4.1.1. Pobór próbek wody	48

4.1.2. Pobór próbek osadów dennych	48
4.2. Przygotowanie próbek do analiz i ich przechowywanie	49
4.2.1. Próbki do analiz molekularnych	49
4.2.2. Próbki do badania stężenia mikrocystyn	49
4.2.3. Próbki do mikroskopowej analizy składu taksonomicznego i biomasy fitoplanktonu	49
4.2.4. Próbki do analiz chemicznych	49
4.3. Analizy molekularne	50
4.3.1. Izolacja całkowitego DNA	50
4.3.2. Amplifikacja DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)	51
4.3.3. Sprawdzanie ilości i jakości DNA	55
4.3.3.1. Elektroforeza w żelu agarozowym	55
4.3.3.2. Fluorymetryczny pomiar stężenia DNA	56
4.3.4. DGGE	56
4.3.4.1. Przygotowanie odczynników do sporządzenia żeli poliakrylamidowych	57
4.3.4.2. Przygotowanie żeli z gradientem denaturującym	59
4.3.4.3. Elektroforeza	60
4.3.4.4. Barwienie żeli	60
4.3.4.5. Wycinanie prążków z żelu, reamplifikacja i przygotowanie do sekwencjonowania	60
4.3.5. Sekwencjonowanie	61
4.3.5.1. Przygotowanie DNA do sekwencjonowania	61
4.3.5.2. Reakcja sekwencjonowania	61
4.3.5.3. Oczyszczanie produktów sekwencjonowania	62
4.3.5.4. Odczyt sekwencji	62
4.3.6. qPCR	62
4.3.6.1. Schemat eksperymentu	63
4.3.6.2. Procedura qPCR	66
4.3.6.3. Wyznaczanie krzywych standardowych	67
4.3.6.4. Specyficzność sond i starterów oraz wydajność reakcji qPCR	67
4.4. Badanie stężenia mikrocystyn w wodzie	68
4.5. Inne analizy fizyko-chemiczne i biologiczne	69
4.5.1. Analiza parametrów fizyko-chemicznych wody <i>in situ</i>	69
4.5.2. Mikroskopowe oznaczanie składu taksonomicznego i biomasy fitoplanktonu, w tym cyjanobakterii	69
4.5.3. Ogólna liczba bakterii	70
4.5.4. Stężenie chlorofilu _a	70
4.5.5. Stężenie azotu i fosforu całkowitego oraz rozpuszczonego węgla organicznego	71
4.6. Analizy statystyczne i komputerowe	71
5. WYNIKI	73
5.1. Analiza czynników różnicujących badane jeziora oraz mogących wpływać na obecność i różnorodność cyjanobakterii - tło środowiskowe	73
5.2. Obecność i różnorodność cyjanobakterii w badanych jeziorach w systemie Wielkich Jezior Mazurskich	78
5.2.1. Skład taksonomiczny cyjanobakterii	78
5.2.1.1. Porównanie dwóch metod oznaczania składu taksonomicznego cyjanobakterii – metody mikroskopowej i metody DGGE-ITS	78

5.2.1.2. Porównanie czułości obydwu używanych metod oznaczania składu taksonomicznego cyjanobakterii	83
5.2.2. Zmienność mazurskich populacji cyjanobakterii w czasie i przestrzeni	84
5.3. Obecność i różnorodność cyjanobakterii potencjalnie toksycznych w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	90
5.4. Występowanie szczepów potencjalnie toksycznych pikocyjanobakterii w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	95
5.5. Analiza liczebności i udziału toksycznych genotypów <i>Microcystis</i> i <i>Planktothrix</i> spp. w całkowitej liczebności tych taksonów w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	99
5.5.1. Krzywe standardowe	99
5.5.2. Testy specyficzności i inhibicji reakcji qPCR	100
5.5.3. Wyniki qPCR w próbkach środowiskowych	101
5.5.4. Liczba komórek potencjalnie toksycznych a rzeczywiste stężenie mikrocystyn	105
5.6. Bakteryjna degradacja mikrocystyn w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	109
6. DYSKUSJA	115
6.1. Cyjanobakterie	115
6.1.1. Badane środowiska występowania cyjanobakterii	115
6.1.2. Identyfikacja taksonomiczna cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	116
6.1.3. Zmienność zespołów cyjanobakterii w czasie i przestrzeni	119
6.1.4. Identyfikacja taksonomiczna toksycznych cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	122
6.1.5. Zmienność populacji toksycznych cyjanobakterii w czasie i przestrzeni	123
6.1.6. Potencjalnie toksyczne pikocyjanobakterie w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	124
6.1.7. Udział toksycznych komórek w populacjach cyjanobakterii z rodzajów <i>Microcystis</i> i <i>Planktothrix</i> w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich.	125
6.1.7.1. Metodologia analiz qPCR	125
6.1.7.2. Zmiany udziału toksycznych genotypów w zespołach cyjanobakterii a możliwość przewidywania toksycznych zakwitów	129
6.2. Degradacja mikrocystyn przez bakterie w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich	132
7. WNIOSKI	136
8. CYTOWANA LITERATURA	138
9. ZAŁĄCZNIKI	172
PODZIĘKOWANIA	185

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów:

ALS	– stwardnienie zanikowe boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis)
Cq	– moment, w którym zaczyna się logarytmiczny przyrost ilości produktu w reakcji qPCR (ang. quantification cycle)
DGGE	– elektroforeza w gradiencie denaturującym (ang. denaturing gradient gel electrophoresis)
DOC	– rozpuszczony węgiel organiczny (ang. dissolved organic carbon)
ELISA	– test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbant assay)
GTR	– model ewolucji sekwencji DNA (ang. generalised time-reversible)
ITS	– rejon DNA pomiędzy genami kodującymi podjednostki rybosomalne 16S i 23S (ang. internal transcribed spacer)
LD ₅₀	– dawka śmiertelna dla połowy populacji (ang. lethal dose)
MC	– mikrocystyny
NGS	– sekwencjonowanie nowej generacji (ang. next-generation sequencing)
OTU	– operacyjna jednostka taksonomiczna (ang. operational taxonomic unit)
PCR	– łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PDC	– parkinsonizm (ang. parkinsonism)
PSP	– ang. paralytic shellfish poisoning
qPCR	– ilościowy PCR (ang. quantitative PCR)
real-time PCR	– PCR w czasie rzeczywistym
SD	– widzialność krążka Secchi’ego (ang. Secchi depth)
TNA	– analiza z zastosowaniem sond TaqMan (ang. TaqMan Assay)
TN	– stężenie azotu całkowitego (ang. total nitrogen)
TP	– stężenie fosforu całkowitego (ang. total phosphorus)
TSI	– indeks stanu troficznego (ang. trophic state index)
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)
WJM	– Wielkie Jeziora Mazurskie

1. Wstęp

1.1. Zagrożenia środowisk wodnych związane z eutrofizacją

Eutrofizacja zbiorników wodnych to zjawisko występujące na Ziemi od początku ich istnienia. Zgodnie z definicją OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) (1982) jest to „wzbogacenie wód w substancje pokarmowe, które stymuluje szereg symptomatycznych zmian, wśród których wzrost produkcji glonów i makrofitów oraz obniżenie jakości wody są uważane za szkodliwe i niekorzystne dla gospodarki człowieka”. Naturalna eutrofizacja to przejaw ewolucji zbiorników wodnych w czasie, od oligotrofii, poprzez mezotrofię, eutrofię i hypereutrofię, aż do naturalnego ich zarastania (Weber 1907). Od zawsze środowiska wodne były poddawane zewnętrznym czynnikom stresowym (np. aktywność wulkaniczna, spływ powierzchniowy powodowany silnymi deszczami czy działalność zwierząt), które mogły przyspieszać eutrofizację wód (Schönborn 2003). Jednak wraz ze wzrostem antropogenicznej presji na zbiorniki wodne, obserwujemy wzmożone tempo eutrofizacji. Odum (1971) wyróżnił dwa rodzaje eutrofizacji – naturalną i antropogeniczną, jednak obecnie wpływ cywilizacji na środowisko jest tak wielokierunkowy, że naturalnych i powodowanych przez człowieka przyczyn eutrofizacji nie da się wyraźnie rozdzielić. Widoczne jest jednak, że obserwowane w ostatnich kilkudziesięciu latach tempo eutrofizacji zbiorników poddanych antropogenicznej presji jest wielokrotnie wyższe niż naturalne (Siuda i wsp. 2013). Eutrofizacja jest więc jednym z najlepiej widocznych skutków oddziaływania człowieka na biosferę, a także jednym z głównych problemów dotyczących ekosystemów wodnych od Arktyki do Antarktyki (Smith i Schindler 2009).

Szybkość eutrofizacji zbiornika wodnego jest różnicą pomiędzy tempem importu a tempem eksportu z niego materii organicznej i biogenów (Siuda 2008). Za wzrastającą żyzność wód odpowiadają przede wszystkim dopływy związków azotu i fosforu (Vollenweider 1968, 1976, Schindler 1971, 1975, 1978), które są podstawą wytwarzania materii organicznej w procesach produkcji pierwotnej, głównie fotosyntezy fitoplanktonu (Lean i Pick 1981). W jeziorach o umiarkowanej trofii czynnikiem limitującym produkcję pierwotną jest zwykle fosfor (Siuda 2001), natomiast w jeziorach silnie zeutrofizowanych, występowanie masowych zakwitów fitoplanktonu może też zależeć od stężenia w wodzie dostępnych form azotu (Berman 2001). Niektóre gatunki cyjanobakterii mogą jednak uniknąć

limitacji azotowej dzięki swojej zdolności do wiązania azotu atmosferycznego (Chorus i Bartram 1999).

Zewnętrzne dopływy biogenów obejmują zarówno źródła punktowe, takie jak odpływy z oczyszczalni ścieków, kanały burzowe czy ujścia rzek, jak i spływy obszarowe z rolniczo wykorzystywanych terenów (pól uprawnych, łąk, pastwisk, hodowli zwierzęcej itp.) i naturalnych ekosystemów lądowych, a także opady atmosferyczne. Tempo gromadzenia się substancji biogennych zależy od wielu czynników, począwszy od charakterystyki zbiornika wodnego (np. typ zbiornika – przepływowy, bezodpływowy, zaporowy; cechy morfometryczne, tempo wymiany wód), charakterystyki zlewni (powierzchnia, ukształtowanie i charakter terenu – urbanizacja, tereny rolnicze, lasy, łąki itp.), czynników pogodowo-klimatycznych (temperatura, ilość opadów, siła i kierunek wiatrów) oraz stopnia antropopresji (np. turystyka, hodowla ryb, obecność punktów zrzutu ścieków z oczyszczalni) (Siuda i wsp. 2013).

Oprócz tego proces importu biogenów do zbiornika to także dopływ wewnętrzny (ang. internal loading), który odbywa się dwiema głównymi drogami: regeneracją związków biogennych w wodzie, oraz uwalnianiem ich z osadów dennych (Pettersson 1998). Odzyskiwanie biogenów może odbywać się poprzez uwalnianie prostych związków na skutek żerowania, lub na drodze bakteryjnej enzymatycznej mineralizacji wielkocząsteczkowych związków do monomerów, które ponownie mogą zostać asymilowane przez mikroorganizmy (Chróst 1991). Zarówno związki fosforu, jak i azotu, mogą być w pewnych okolicznościach uwalniane z osadów dennych do kolumny wody (Katsev i wsp. 2006, Özkundakci i wsp. 2011). Warunki beztlenowe przy dnie oraz w osadach dennych silnie stymulują uwalnianie fosforu mineralnego związanego w kompleksach z żelazem (Pettersson i wsp. 1993, Søndergaard i wsp. 2003). O dopływie wewnętrznym decydują dwa główne czynniki: beztlenowość środowiska oraz zdolność sorpcyjna osadów (tzw. wskaźnik EPC0). Wewnętrzny dopływ fosforu może być nawet równie duży jak dopływ zewnętrzny (Søndergaard i wsp. 1999), a główną formą tego pierwiastka uwalnianą z osadów jest bezpośrednio dostępny w asymilacji dla fitoplanktonu ortofosforan (Siuda 1984), w odróżnieniu od form fosforu z dopływu zewnętrznego, które zwykle są dostępne dla producentów pierwotnych dopiero po biologicznej transformacji do organicznych połączeń fosforu do ortofosforanu (Chróst 1987). Zasilanie wód powierzchniowych w związki fosforu może również następować na skutek ich mieszania. Najbardziej intensywnie ten proces występuje w jeziorach polimiktycznych, stosunkowo płytkich, a w głębokich jeziorach

stratyfikowanych termicznie najsilniejszy jest w czasie wiosennego i jesiennego mieszania się wód (okres homotermii).

Procesy eksportu związków biogenych ze zbiorników wodnych to: respiracja materii organicznej przez heterotroficzne mikroorganizmy w postaci CO₂ (Prairie i Cole 2009), denitryfikacja (Seitzinger 1988, Saunders i Kalff 2001), anammox - beztlenowe utlenianie amoniaku (Hamersley i wsp. 2009), odkładanie materii organicznej w osadach dennych, odpływ wody ze zbiornika oraz wynoszenie materii organicznej poza zbiornik (np. przez żerowanie ptaków, rybołówstwo) (Siuda 2008).

Ekosystemy wodne są bardziej wrażliwe na zewnętrzne oddziaływania niż środowiska lądowe. Podczas gdy na lądzie allochtoniczne substancje są częściej wiązane z cząsteczkami gleby, co zapobiega przenikaniu ich do rozleglejszych obszarów, w wodzie obce substancje łatwiej dyfundują i rozprzestrzeniają się w ekosystemie (Schönborn 2003). Procesy eutrofizacyjne wpływają na zbiorniki wodne w wielokierunkowy sposób. Efektami nadmiernego dopływu biogenów są najczęściej: zmniejszona przezroczystość wody, niedobór tlenu, obniżona jakość wody do celów rekreacyjnych lub jako źródło wody pitnej. Konsekwencje dla struktury biologicznej zbiornika to przede wszystkim zwiększona biomasa fitoplanktonu i zmiany w jego składzie, mogące prowadzić do toksycznych zakwitów, zmiany w składzie gatunkowym makrofity, zmniejszona różnorodność biologiczna czy zmiany w populacji ryb (Smith 2003).

Hypereutrofizacja całkowicie zaburza stabilność i zmienia funkcjonowanie ekosystemów wodnych. W zbiorniku wodnym, w którym utrzymuje się stan hypereutrofii (indeks stanu troficznego Carlsona – TSI przekraczający 70, Carlson 1977), spada przezroczystość wody z powodu nadmiernego rozwoju organizmów fitoplanktonowych, fitoplankton ogranicza dostęp światła do głębszych warstw wody, co powoduje zahamowanie tam aktywności fotosyntetycznej, a to kolei powoduje okresowe deficyty tlenowe (dużej produkcji tlenu przez organizmy fotosyntetyzujące przy powierzchni, towarzyszy wysoka aktywność respiracyjna). Różnorodność biologiczna konsekwentnie spada, co może doprowadzić do całkowitego zaniku tlenowych producentów pierwotnych żyjących w głębszych warstwach wody (Schönborn 2003). W wyniku braku tlenu i zachodzących procesów beztlenowych kurczy się również zasięg występowania ryb, zniszczeniu ulegają miejsca tarła, co prowadzi do zmniejszania populacji lub całkowitego ich wymierania. Kolejnym objawem niestabilności hypereutroficznego ekosystemu są ekstremalne wahania biomasy fitoplanktonu (Barica i wsp. 1992). Wszystkie te czynniki mogą doprowadzić do pojawiania się masowych zakwitów

cyjanobakterii, które nie tylko skutkują zmianami w strukturze zooplanktonu, początkowo redukując biomasę filtratorów, a następnie zmniejszając liczebność planktonowych drapieżników (Burns 1968), ale także są niezwykle groźne ze względu na możliwość uwalniania do wody toksyn przez różne gatunki sinic.

Ważnym aspektem eutrofizacji jest również zagrożenie związane z występującymi w wodzie patogennymi mikroorganizmami. Razem z substancjami biogennymi dopływającymi na przykład z oczyszczalni ścieków, do wody mogą dostawać się niebezpieczne bakterie kałowe (Hofmann i Beaulieu 2001). Również samo podwyższone stężenie biogenów może wpływać na liczebność, skład i możliwości przetrwania patogenów, które naturalnie występują w ekosystemach wodnych (Smith i Schindler 2009). Przykładowo zwiększenie stężenia azotu i dostępności fosforu zwiększa szybkość replikacji wirusów wodnych (Wilson i wsp. 1996). Liczebność w wodzie bakterii *Vibrio cholerae* jest również pozytywnie skorelowana ze stężeniem związków biogennych, stopień eutrofizacji więc może mieć wpływ na prawdopodobieństwo wystąpienia epidemii cholery w podatnych populacjach ludzkich (Cottingham i wsp. 2003, Gregoracci i wsp. 2012).

Wiele czynników wpływających na trofię zbiorników wodnych w strefie klimatu umiarkowanego jest regulowanych przez temperaturę. Długość okresów stratyfikacji i homotermii jezior, czas topnienia pokrywy lodowej wiosną, średnia temperatura wody w lecie czy częstość występowania temperatur ekstremalnych zależy od zewnętrznych czynników klimatycznych, tak więc zmiany klimatu mogą silnie wpływać na ekologię jezior (Shimoda i wsp. 2011). W konsekwencji to jeziora są jednym z pierwszych typów ekosystemów, w których skutki zmian klimatycznych są najbardziej widoczne (Adrian i wsp. 2009, Williamson i wsp. 2009).

1.2. Zakwity cyjanobakterii jako jeden ze skutków hypereutrofizacji

Cyjanobakterie są jedną z pierwszych form życia, która pojawiła się na Ziemi (Brock 1973, Schopf 1996). Najprawdopodobniej były pierwszymi producentami pierwotnymi, oraz pierwszymi organizmami wydzielającymi tlen cząsteczkowy do atmosfery (Chorus i Bartram 1999). Większość cyjanobakterii, nazywanych również sinicami, jest tlenowymi fotoautotrofami, dzięki czemu w swoim cyklu życiowym potrzebują światła, wody, dwutlenku węgla i substancji nieorganicznych. Część sinic może także, w określonych

warunkach środowiskowych (np. przy niedostatecznym natężeniu światła), odżywiać się heterotroficznie, prowadząc miksotroficzny metabolizm (Fay 1965).

Cyjanobakterie to prokariotyczne mikroorganizmy jednokomórkowe, kolonijne (np. tworzące duże skupienia, formy nitkowate) lub żyjące w postaci pojedynczych komórek. W odróżnieniu od eukariotycznych glonów fitoplanktonowych, komórki sinic nie posiadają jądra i organelli komórkowych. Cyjanobakterie otoczone są ścianą komórkową zbudowaną z peptydoglikanu. Barwniki fotosyntetyczne zlokalizowane są w tylakoidach rozmieszczonych w cytoplazmie. Wszystkie cyjanobakterie zawierają chlorofil_a oraz fikocyjaninę z grupy fikobiliprotein, której zawdzięczają swoją nazwę i zielono-niebieski kolor. Dodatkowo w komórce mogą znajdować się też pomocnicze barwniki, takie jak karotenoidy i inne fikobiliproteiny np. fikoerytryna czy allofikocyjanina (Douglas 1994).

Sinice spotykane są w wielu środowiskach, na wszystkich szerokościach geograficznych. Często są pionierskimi organizmami, które jako pierwsze kolonizują dane środowisko, w szczególności środowiska ekstremalne. Cyjanobakterie mogą występować na lądzie na powierzchni skał, gleby czy roślin. Mogą również tworzyć symbiotyczne relacje z roślinami, zwierzętami lub grzybami, takie jak na przykład porosty (Rai 1990). Głównym środowiskiem występowania są jednak wody, zarówno ekosystemy słodkowodne, jak i morskie. Mogą występować w środowiskach ekstremalnie zimnych lub ciepłych np. gorących źródłach (Castenholz 1973), arktycznych i antarktycznych jeziorach (Skulberg 1996a), w śniegu lub lodzie (Kol 1968, Laamanen 1996), a także w miejscach o bardzo dużym zasoleniu (Chorus i Bartram 1999).

Biomasa i struktura gatunkowa organizmów fitoplanktonowych w wodzie jest zależna, oprócz dostępności światła i dwutlenku węgla, od stężenia kluczowych pierwiastków biogennych, przede wszystkim azotu i fosforu. Przy niskich stężeniach biogenów (w warunkach oligotroficznych) występuje zwykle duża różnorodność biologiczna. Możliwa jest dzięki złożonym relacjom pokarmowym, obecności wyspecjalizowanych nisz oraz procesom konkurencji, które razem utrzymują w ekosystemie równowagę, pozwalającą na współegzystowanie wielu różnych gatunków fitoplanktonu (Huisman i Weissing 1999, Dignum i wsp. 2005). Przy wysokich stężeniach pierwiastków biogennych nie tylko wzrasta biomasa fitoplanktonu, ale także zmniejsza się jego różnorodność biologiczna, a w składzie gatunkowym zaczynają dominować cyjanobakterie, zwłaszcza rodzaje tworzące duże kolonie, takie jak *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* (d. *Anabaena*), *Limnothrix*, *Microcystis*, czy *Planktothrix* (Dokulil i Teubner 2000), mogące w konsekwencji powodować zakwity.

Zaawansowana eutrofizacja (hypereutrofizacja) jest więc ściśle związana z dominacją cyjanobakterii w wodach (Pizzolon i wsp. 1999, Dokulil i Teubner 2000).

Powodem, dla którego to cyjanobakterie zyskują zwykle przewagę konkurencyjną i stają się dominującym składnikiem fitoplanktonu w wodach eutroficznych jest zespół cech i przystosowań posiadanych przez te mikroorganizmy. Pomocnicze barwniki fotosyntetyczne sprawiają, że sinice mogą wykorzystywać w fotosyntezie zieloną, żółtą i pomarańczową część spektrum światła słonecznego (500-650 nm), które są rzadko wykorzystywane przez inne organizmy fitoplanktonowe. Cyjanobakterie są zdolne do życia i utrzymywania dość wysokiego tempa wzrostu przy niskich intensywnościach światła, nawet w środowisku, do którego dociera wyłącznie zielone widmo promieniowania słonecznego. Umożliwia to życie w głębszych partiach wód, “w cieniu” innych organizmów planktonowych, oraz przewagę konkurencyjną nad np. zielenicami i okrzemkami w mętnej wodzie o dużej biomacie fitoplanktonu lub przy innych czynnikach ograniczających dostępność światła (Chorus i Bartram 1999, Kardinaal i Visser 2005). Małe wymagania świetlne pozwalają też na tworzenie gęstych powierzchniowych zakwitów, podczas których dostępność światła dla poszczególnych komórek cyjanobakterii może być bardzo ograniczona (Dokulil i Teubner 2000). Lepsza adaptacja do słabych warunków świetlnych może wynikać z faktu, że sinice, jako organizmy prokariotyczne, mają niższe koszty energetyczne utrzymania procesów życiowych niż konkurujące z nimi eukariotyczne mikroorganizmy fitoplanktonowe (Gons i Mur 1980, Huisman i Hulot 2005).

Wiele gatunków cyjanobakterii posiada aerotopy (“wakuole” gazowe), czyli cylindryczne struktury w cytoplazmie wypełnione gazem, które sprawiają, że ciężar właściwy komórki może być niższy niż gęstość wody. Pozwala to na regulowanie rozmieszczenia wertykalnego komórek w słupie wody (Walsby 1987). Dzięki tej zdolności sinice mogą gromadzić się na głębokości o najbardziej sprzyjających warunkach, np. o odpowiedniej intensywności światła, dostępności dwutlenku węgla lub związków biogennych. Aerotopy mają też udział w tworzeniu gęstych zakwitów, ponieważ utrzymują komórki cyjanobakterii na powierzchni zbiornika, hamując jednocześnie wzrost innych gatunków konkurujących o światło (Paerl i Huisman 2008).

Wiązanie azotu atmosferycznego jest kolejnym procesem sprzyjającym dominacji niektórych gatunków cyjanobakterii. Taksony sinic wiążące azot atmosferyczny mają dzięki temu najprostsze wymagania życiowe ze wszystkich żywych organizmów (Chorus i Bartram 1999). Komórki wegetatywne rodzajów takich jak np. *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*,

Dolichospermum, *Nodularia* czy *Nostoc* mogą wykształcać heterocysty, w których przy pomocy enzymu nitrogenazy cząsteczkowy azot atmosferyczny (N_2) jest redukowany bezpośrednio do azotu amonowego (NH_4^+). Występują również gatunki zdolne do asymilowania azotu atmosferycznego, ale nie tworzące heterocyst np. *Trichodesmium* spp. (Carpenter i Kitchell 1992). Masowy rozwój gatunków wiążących azot atmosferyczny może być związany z warunkami limitacji azotowej, kiedy w wodzie czasowo brakuje zarówno jonów amonowych jak i azotanów (Kardinaal i Visser 2005).

Dodatkowo rozwojowi cyjanobakterii, zarówno wiążących azot atmosferyczny, jak i nie posiadającym tej zdolności, sprzyja niski stosunek azotu do fosforu w wodzie. Optymalny stosunek TN:TP (azotu całkowitego do fosforu całkowitego) dla fitoplanktonowych mikroorganizmów eukariotycznych wynosi 16-23:1, podczas gdy dla tworzących zakwity cyjanobakterii wynosi on 10-16:1 (Schreurs 1992). Smith (1983) wykazał, że sinice są lepsze w konkurencji o azot niż o fosfor i dlatego dominują w wodach, gdzie występuje limitacja azotowa.

Cyjanobakterie mogą przechowywać w cytoplazmie biogeny i metabolity (np. w formie polifosforanów, granulek glikogenu czy lipidów), które pozwalają im na wygrywanie konkurencji z innymi organizmami fitoplanktonowymi, kiedy dostępność związków biogennych jest niska (Fay i Van Baalen 1987, Dignum i wsp. 2005). Szczególnie duża jest ich zdolność do przechowywania nadmiaru związków fosforu w postaci polifosforanów wewnątrzkomórkowych, pozwalająca nawet na dwa do czterech podziałów komórki (4 - 32-krotne powiększenie biomasy) (Chorus i Bartram 1999).

Inną cechą sprzyjającą dominacji sinic w środowiskach eutroficznych jest system anhidrazy węglanowej sprzężony z aktywnym transportem dwutlenku węgla potrzebnego w fotosyntezie (Badger i wsp. 2002, Price i Badger 2002). W wodach o wysokim pH, charakterystycznym dla zbiorników mocno zeutrofizowanych, w których brak jest wolnego, rozpuszczonego CO_2 na skutek związania go w węglanach, system ten jest bardziej efektywny u cyjanobakterii, niż u innych mikroorganizmów przeprowadzających fotosyntezę (Shapiro 1973, 1990, Raven 1985).

Cyjanobakterie są też w większym stopniu, niż inne mikroorganizmy fitoplanktonowe, odporne na wyżeranie przez zooplankton. Przykładowo wioślarki z rodzaju *Daphnia* mogą efektywnie żerować, jeśli wielkość cząstek pokarmu nie przekracza 50 μm (Burns 1968), podczas gdy cyjanobakterie nitkowate lub kolonie cyjanobakterii wielokrotnie przekraczają te wymiary. Nitkowate sinice (np. *Planktothrix* spp.) mogą również zatykać aparaty filtracyjne

wielu gatunków zwierząt zooplanktonowych i przez to redukować ich efektywność pobierania pokarmu (Gliwicz i Lampert 1990, DeMott i wsp. 2001). Dodatkowo wartość odżywcza komórek sinic jest niska, ze względu na małą zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych (Huisman i Hulot 2005). Wykazano, że zwierzęta zooplanktonowe nie rozwijają się dobrze, jeśli w ich diecie występują wyłącznie cyjanobakterie, dlatego w warunkach naturalnych zooplankton preferuje mikroglony eukariotyczne o lepszej jakości odżywczej (Weers i Gulati 1997, Müller-Navarra i wsp. 2004).

Oddziaływania allelopacyjne, dzięki produkcji wydzielanych poza komórkę metabolitów i toksyn, to kolejna cecha sinic umożliwiająca im uzyskanie przewagi konkurencyjnej nad innymi glonami fitoplanktonowymi. Przykładowo *Microcystis* spp. może hamować wiązanie dwutlenku węgla przez inne mikroorganizmy fotosyntetyzujące (Sukénik i wsp. 2002), a *Dolichospermum* spp. wytwarza toksynę, która paraliżuje komórki zielenic *Chlamydomonas* spp. (Kearns i Hunter 2001). Toksyne sinic mogą także hamować rozwój lub nawet zabijać zooplanktonowe wrotki, wioślarki i widłonogi (Gilbert 1994, Ferrão-Filho i wsp. 2000, Reinikainen i wsp. 2002), chroniąc w ten sposób cyjanobakterie przed wyżeraniem (Huisman i Hulot 2005).

Istnieje jednak kilka aspektów, w których sinice przegrywają konkurencję z fitoplanktonem eukariotycznym. Cyjanobakterie mają wyższe wymagania dotyczące pierwiastków śladowych (Reuter i Petersen 1987), dlatego w niektórych środowiskach czynnikiem limitującym mogą być dla nich kadm, kobalt, magnez i cynk (Coale 1991, Morel i wsp. 1994, Lee i wsp. 1995).

Tempo wzrostu sinic jest zwykle znacznie niższe, niż w przypadku wielu gatunków glonów eukariotycznych (Reynolds i wsp. 1984). Wolne tempo wzrostu wymaga długich czasów retencji wody, aby cyjanobakterie mogły osiągać znaczące liczebności. Sinice nie tworzą więc zakwitów w wodzie płynącej, z krótkimi czasami retencji, na przykład w rzekach. Jednak ograniczona ilość naturalnych wrogów i zdolność do regulacji pływalności, która zapobiega sedymentacji, często rekompensują straty wynikające z wolnego tempa wzrostu (Chorus i Bartram 1999).

Najważniejszym czynnikiem, obok eutrofizacji wód, promującym dominację cyjanobakterii jest podwyższona temperatura. Sinice osiągają maksymalne tempo wzrostu w temperaturze 25 °C lub wyższej (Robarts i Zohary 1987). Optymalne temperatury dla innych grup fitoplanktonu, takich jak zielenice lub okrzemki, są niższe. Ocieplanie się klimatu powoduje wcześniejszą stratyfikację termiczną i zarazem późniejszą destratyfikację jezior

w klimacie umiarkowanym, a nagrzewanie się powierzchniowych warstw stratyfikację dodatkowo wzmacnia i redukuje mieszanie się warstw wody. Czynniki te sprawiają, że wydłużeniu ulega okres, kiedy panują optymalne warunki dla rozwoju cyjanobakterii (Paerl i Huisman 2008). W klimacie umiarkowanym dominacja cyjanobakterii zaczyna się najczęściej po “fazie czystej wody”, późną wiosną lub wczesnym latem, a zakwity mogą trwać do późnego lata lub nawet wczesnej jesieni (Wetzel 2001).

Zmiany klimatyczne sprzyjają również znaczącemu poszerzaniu się zasięgu geograficznego niektórych gatunków cyjanobakterii. *Cylindrospermopsis raciborskii* był początkowo opisywany jako gatunek występujący w regionach tropikalnych lub subtropikalnych. W południowej Europie po raz pierwszy opisano go w 1930 roku, a do końca XX wieku poszerzył swój zasięg daleko na północ i obecnie jest rozpowszechniony w jeziorach północnych Niemiec (Wiedner i wsp. 2007), a także pojawia się w jeziorach polskich (Kokociński i wsp. 2011).

Wraz z prognozowanym dalszym ocieplaniem się klimatu, w XXI wieku średnia światowa temperatura powietrza może wzrosnąć od 1,8 °C do nawet 6,4 °C (Bates i wsp. 2008, Stocker i wsp. 2013). Cyjanobakterie i powodowane przez nie często toksyczne zakwity będą stawały się coraz groźniejszym i ważniejszym globalnym problemem ekologicznym (Paerl i Huisman 2009).

1.3. Toksyny wytwarzane przez cyjanobakterie

Cyjanobakterie wytwarzają wiele metabolitów, które mogą być toksyczne dla zwierząt i ludzi. Udowodniono, że część z nich może być bardziej niebezpieczna dla lądowych kręgowców, niż dla organizmów wodnych. Uważa się więc, że substancje te mogą tylko przypadkowo wywoływać toksyczny efekt w organizmach zwierząt, a ich rzeczywiste funkcje dla komórek cyjanobakterii są inne. W komórkach sinic można znaleźć również dużo innych wtórnych metabolitów, nietoksycznych dla kręgowców, z których wiele ma niepoznane dotychczas znaczenie (Chorus i Bartram 1999). Toksyny wytwarzane przez cyjanobakterie zazwyczaj klasyfikuje się ze względu na ich oddziaływanie na organizmy ssaków i wyróżnia się trzy główne grupy: hepatotoksyny, neurotoksyny i dermatotoksyny (Metcalf i Codd 2004) (Tab. 1). Cyjanotoksyny mogą być wytwarzane przez szerokie spektrum gatunków sinic, żyjących w wodach słodkich, jak i słonych, o różnym stopniu eutrofizacji (Tab. 1).

Z wytwarzania toksyn znane są zarówno formy kolonijne oraz nitkowate, jak i jednokomórkowe. W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się również pikocyjanobakteriom, rozmiarowo najmniejszym znanym taksonom sinic, które przez dekady były uważane za nietoksyczne, a ich znaczenie w ekosystemach wodnych było często pomijane (Jasser i wsp. 2010). Nowe badania wskazują jednak, że pikocyjanobakterie, m. in. z rodzajów *Cyanobium*, *Merismopedia*, *Synechococcus*, mogą wytwarzać toksyny z grupy hepatotoksyn - mikrocystyny (Bláha i Maršálek 1999, Carmichael i Li 2006, Furtado i wsp. 2009, Bukowska i wsp. 2014b), a z rodzajów *Prochlorococcus* i *Synechococcus* neurotoksynę - BMAA (Cox i wsp. 2005).

Niektóre gatunki sinic mogą wytwarzać jednocześnie kilka różnych toksyn. Przykładem jest szczep NRC 525-17 *Dolichospermum flos-aquae*, który produkuje jednocześnie neurotoksynę – anatoksynę-a(S) i kilka wariantów mikrocystyn z grupy hepatotoksyn (Chorus i Bartram 1999). Natomiast w obrębie jednego gatunku cyjanobakterii mogą występować szczepy toksyczne, jak i nietoksyczne, ponadto mogą one współegzystować w jednym środowisku (Chorus i Bartram 1999). Toksyczne szczepy cyjanobakterii mogą też różnić się ilością wytwarzanych toksyn (Bolch i wsp. 1997, Vezie i wsp. 1998). Szczepów toksycznych i nie wytwarzających toksyn nie da się rozróżnić za pomocą metod mikroskopowych.

Tabela 1. Rodzaje toksyn wytwarzanych przez cyjanobakterie i taksony je produkujące (za Chorus i Bartram 1999, Cox i wsp. 2005, Paerl i Huisman 2009, Boopathi i Ki 2014)

Toksyny	Taksony
Hepatotoksyny	
Mikrocystyna	<i>Anabaenopsis, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Arthrospira, Cyanobium, Dolichospermum, Hapalosiphon, Merismopedia, Microcystis, Nostoc, Phormidium, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Synechococcus, Synechocystis</i>
Nodularyna	<i>Nodularia, Nostoc</i>
Cylindrospermopsyna	<i>Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Dolichospermum, Planktothrix, Raphidiopsis, Umezakia, Sphaerospermopsis</i>
Neurotoksyny	
Anatoksyna-a	<i>Aphanizomenon, Dolichospermum, Planktothrix</i>
Anatoksyna-a(S)	<i>Dolichospermum, Planktothrix</i>
Saksitoksyna	<i>Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Dolichospermum, Lyngbya, Planktothrix, Raphidiopsis, Scytonema</i>
BMAA	<i>Aphanizomenon, Calothrix, Chlorogloeopsis, Chroococcidiopsis, Cylindrospermopsis, Dolichospermum, Fischerella, Lyngbya, Microcystis, Myxosarcina, Nodularia, Nostoc, Phormidium, Planktothrix, Plectonema, Prochlorococcus, Scytonema, Symploca, Synechococcus, Trichodesmium</i>
Dermatotoksyny	
Aplysiatoksyna	<i>Lyngbya, Planktothrix, Schizothrix</i>
Debromoaplysiatoksyna	<i>Lyngbya</i>
Lyngbyatoksyna	<i>Lyngbya</i>
Lipopolisacharyd	wszystkie

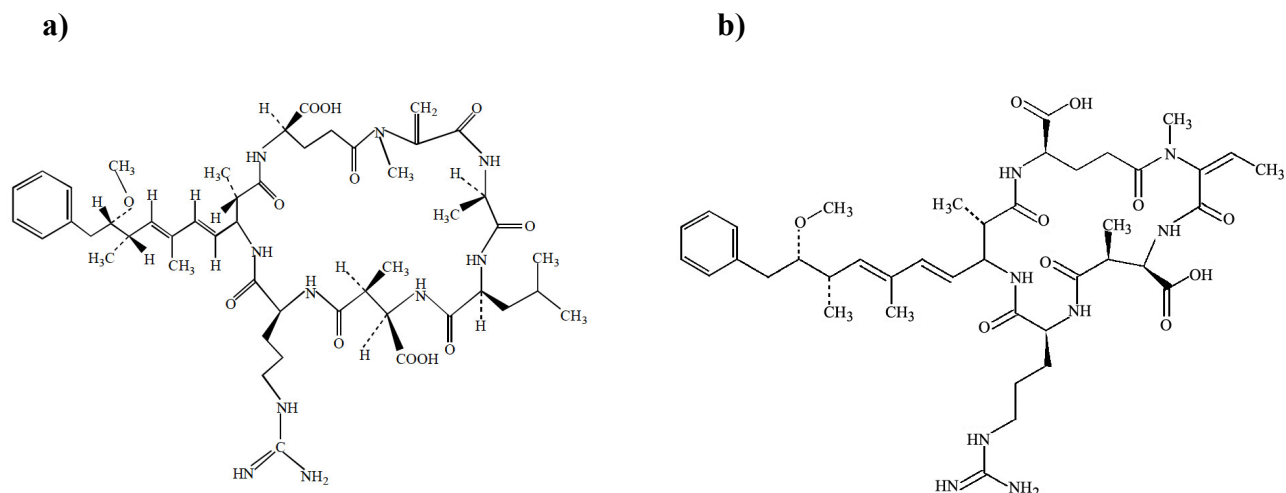
1.3.1. Hepatotoksyny

1.3.1.1. Cykliczne peptydy

Jest to najszerzej rozpowszechniony i najczęściej występujący typ toksyn cyjanobakteryjnych w ekosystemach słodko- i słonowodnych (Chorus i Bartram 1999, Metcalf i Codd 2004). Do grupy cyklicznych peptydów zalicza się mikrocyistyny i nodularyny. Niniejsza praca jest poświęcona analizie zakwitów sinic, w których mikrocyistyny z grupy hepatotoksyn mogą stanowić zagrożenie dla ludzi i zwierząt.

1.3.1.1.1. Toksyny wytwarzające mikrocyistyny i nodularyny

Mikrocyistyny są produkowane przez szerokie spektrum rodzajów cyjanobakterii, zarówno tworzących jak i nie tworzących zakwitów, żyjących w wodach słodkich i słonawych, m. in. *Anabaenopsis*, *Arthrospira*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Plectonema*, *Synechococcus* i *Synechocystis* spp. (Chorus i Bartram 1999, Metcalf i Codd 2004, Sivonen i Börner 2008, Jasser i Callieri 2017). Toksyny te mogą być też wytwarzane przez sinice żyjące na lądzie, np. *Hapalosiphon* sp. (Prinsep i wsp. 1992). Produkcja nodularyn została udokumentowana u morskiego gatunku cyjanobakterii – *Nodularia spumigena* (Metcalf i Codd 2004), oraz w rodzaju *Nostoc* (Boopathi i Ki 2014).



Rysunek 1. Budowa cząsteczki a) mikrocyistyny-LR i b) nodularyny.

1.3.1.1.2. Budowa cząsteczkowa toksyn

Mikrocystyny to cykliczne heptapeptydy, składające się z pięciu aminokwasów niebiałkowych, oraz dwóch aminokwasów w konformacji L (Rys. 1a). Za toksyczność odpowiada rzadki aminokwas Adda (kwas 3-amino-9-metoksy-2,6,8-trimetylo-10-fenylodeka-4,6-dienowy) (Carmichael 1997). Istnieje wiele różnych wariantów mikrocystyn, dotychczas odkryto ich przynajmniej kilkadziesiąt (Diehnelt i wsp. 2006). W poszczególnych wariantach w cząsteczce mikrocystyny mogą występować substytucje wszystkich siedmiu aminokwasów, jednak najczęściej zastępowane są L-aminokwasy w pozycjach 2 i 4 (Kurmayer i Christiansen 2008). Inną częstą zmiennością jest demetylacja aminokwasów występujących w pozycjach 3 i 7 (Chorus i Bartram 1999). Najczęściej spotykanym wariantem jest mikrocystyna-LR (Rys. 1a) (Metcalf i Codd 2004).

Nodularyna jest natomiast cyklicznym pentapeptydem, również posiadającym w swojej strukturze aminokwas Adda, oraz trzy inne niebiałkowe aminokwasy, a także jeden aminokwas w konformacji L (Rys. 1b).

1.3.1.1.3. Właściwości i toksyczność

Cząsteczki mikrocystyn i nodularyn są rozpuszczalne w wodzie i dzięki swojej stabilności bardzo długo mogą pozostawać w środowisku. Ich uwolnienie do wody następuje zwykle dopiero po lizie komórek cyjanobakterii wytwarzających toksyny. Mikrocystyny i nodularyny nie mogą przenikać bezpośrednio przez błony lipidowe do komórek bakterii, roślin i zwierząt, lecz wykorzystują w tym celu transbłonowe transportery, które zwykle dostarczają komórkom niezbędne składniki odżywcze lub związki chemiczne (Chorus i Bartram 1999). Toksyny te mogą akumulować się na kolejnych poziomach troficznych, zarówno w organizmach bezkręgowców (zooplankton, mięczaki), jak i kręgowców (ryby) (Watanabe i wsp. 1992, Prepas i wsp. 1997, Beattie i wsp. 1998).

Toksyczność mikrocystyn i nodularyn dla komórek zwierząt wiąże się z hamowaniem przez nie działania kluczowych enzymów komórkowych – fosfataz białkowych m. in. PP1 i PP2, które regulują procesy gospodarki energetycznej i fizjologicznej komórek (Metcalf i Codd 2004). Następuje deformacja białek cytoszkieletu, odpowiedzialnych za nadawanie kształtu komórkom wątroby. Ostre zatrucie toksynami objawia się gromadzeniem krwi w wątrobie, a następnie krwotokami z tego i innych narządów wewnętrznych, i prowadzi do

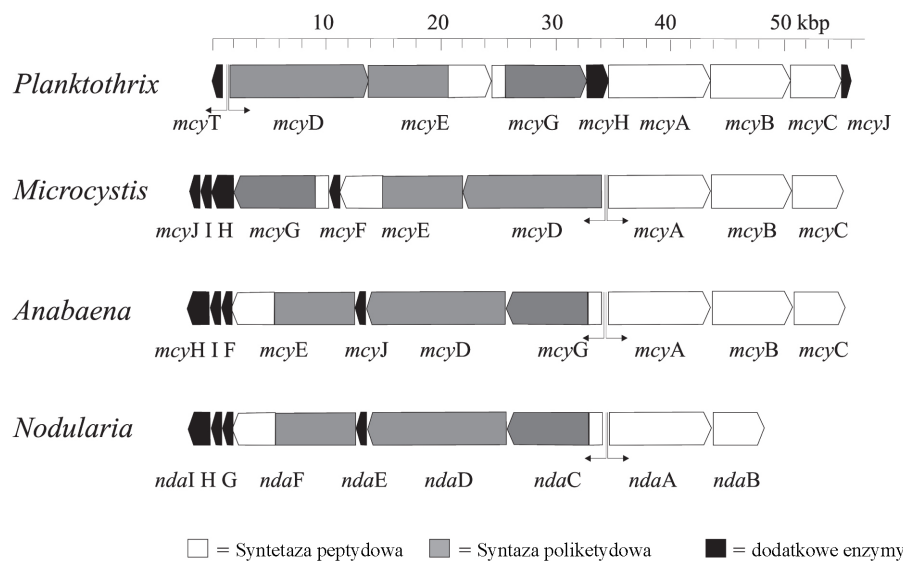
zatrzymania krążenia z powodu utraty krwi i niewydolności serca, a w konsekwencji do śmierci (Metcalf i Codd 2004). Działanie toksyn jest bardzo szybkie i efekty zatrucia nimi widoczne są już po kilku minutach (Wood 2016).

Hepatotoksyczne cyjanotoksyny są jednymi z najsilniejszych znanych trucizn. LD_{50} dla mikrocytyny wynosi 50 $\mu\text{g/kg}$, co oznacza, że jest ona 10 razy bardziej toksyczna niż strychnina ($LD_{50}=500 \mu\text{g/kg}$) i 200 razy bardziej toksyczna niż cyjanek sodu ($LD_{50}=10000 \mu\text{g/kg}$) (Carmichael 1991). Ponadto ich niebezpieczeństwo polega na tym, że efekty ich działania często są widoczne dopiero przy narażeniu na dawkę bliską śmiertelnej (Carmichael 1991).

Zarówno mikrocytyny, jak i w szczególności nodularyny mogą wykazywać działanie karcynogenne. Natomiast w już istniejących guzach nowotworowych przyczyniają się do ich wzrostu i rozwoju (Metcalf i Codd 2004).

1.3.1.1.4. Genetyczne podstawy toksyczności

Cykliczne peptydowe hepatotoksyny syntetyzowane są nierybosomalnie, przez enzymatyczne kompleksy – syntetazę peptydową (NRPS) i syntazę poliketydową (PKS). Enzymy te kodowane są przez klastery genów *mcy* (dla mikrocytyn) lub *nda* (dla nodularyn), składający się z dziewięciu lub dziesięciu genów, pogrupowanych w dwa dwukierunkowo transkrybowane operony (Rys. 2) (Pearson i Neilan 2008).



Rysunek 2. Budowa klastra genów *mcy* lub *nda* u wybranych taksonów cyjanobakterii (zmienione za Kurmayer i Christiansen 2008).

Istnieje znaczące podobieństwo pomiędzy klastrem *mcy* u różnych rodzajów cyjanobakterii (Rys. 2). Osiem genów (*mcy*ABCDEFGHJ) jest zawsze obecnych, a tylko trzy – *mcy*I, *mcy*F i *mcy*T nie występują u wszystkich taksonów (Kurmayer i Christiansen 2008). Tak duże podobieństwo, oraz fakt występowania szczepów toksycznych i nietoksycznych w obrębie jednego gatunku pozwalały na przypuszczenia, że klastery *mcy* może przenosić się za pomocą horyzontalnego transferu genów. Jednak badania pozostałości klastra *mcy* u taksonów nie produkujących mikrocystyn wykazały, że niejednorodna dystrybucja tych genów nie wynika z horyzontalnego transferu genów, ale z ich utraty u niektórych szczepów w procesie ewolucji (Christiansen i wsp. 2008, Kurmayer i Christiansen 2008).

1.3.1.1.5. Udział toksycznych genotypów w populacji

Ponieważ w zbiorniku wodnym mogą współegzystować szczepy jednego gatunku, posiadające i nie posiadające genów toksyczności, udział toksycznych komórek w populacji może ulegać zmianom. Dotychczasowe badania wskazują, że udział toksycznych genotypów w czasie jednego sezonu wegetacyjnego jest raczej stały. Jest mało prawdopodobne, aby w ciągu kilku miesięcy populacja zmieniła się z produkującej znaczne ilości mikrocystyn, do zupełnie nietoksycznej, i odwrotnie (Kurmayer i Christiansen 2008). Przykładowo Rinta-Kanto i wsp. (2005) czy Yoshida i wsp. (2007) zbadali, że udział toksycznych genotypów *Microcystis* sp. w jeziorach Erie (USA) i Mikata (Japonia) jest w czasie sezonu niski (do 35%) i dość stały. Czynniki wpływające na udział toksycznych komórek są do tej pory słabo poznane i wymagają dalszych badań. Kurmayer i Kutzenberger (2003) odkryli jednak, że udział toksycznych genotypów może wzrastać wraz z całkowitą liczebnością populacji. Yoshida i wsp. (2007) sugerują również udział cyjanofagów w krótkoterminowych zmianach w udziale procentowym toksycznych komórek. Poznanie mechanizmów wpływających na zmiany udziału komórek produkujących mikrocystyny może mieć ogromny wpływ na możliwości przewidywania toksycznych zakwitów. Jeśli badając populacje cyjanobakterii przed wystąpieniem zakwitu, będzie można przewidzieć jaki będzie udział komórek toksycznych jeśli zakwit wystąpi, i tym samym, czy będzie on toksyczny, da to ogromne możliwości wczesnego ostrzegania i ochrony ludzi i zwierząt przed potencjalnymi skutkami kontaktu z toksynami.

1.3.1.1.6. Czynniki środowiskowe wpływające na wytwarzanie mikrocystyn

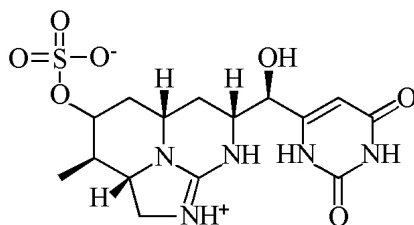
Badania wykazały, że wiele różnych czynników może wywoływać zmiany w zawartości mikrocystyn w komórkach cyjanobakterii. Według teorii Orr'a i Jones'a (1998) wytwarzanie mikrocystyn jest wprost proporcjonalnie związane z tempem wzrostu i szybkością podziałów komórkowych, więc oddziaływania czynników środowiskowych na biosyntezę mikrocystyn są w tym układzie pośrednie. Nowsze badania jednak wskazują, że w klastrze genów *mcy* znajdują się miejsca wiązania dla regulatorów transkrypcji takich jak NtcA (regulujący odpowiedź na stężenie azotu), FurA (regulujący pobieranie żelaza) czy RcaA (fotoreceptor regulujący odpowiedź na światło) (Kaebernick i wsp. 2002, Ginn i wsp. 2010, Alexova i wsp. 2011). Transkrypcja genów klastra *mcy* jest więc regulowana przez kompleksowy system oddziaływań, związany m. in. z limitacją pierwiastków biogennych czy odpowiedzią na czynniki stresowe (Boopathi i Ki 2014). Tonk i wsp. (2005) udowodnili natomiast pozytywną zależność między poziomem transkrypcji genów *mcy* a tempem produkcji mikrocystyny.

Nishizawa i wsp. (1999), Kaebernick i wsp. (2000) czy Tonk i wsp. (2005) wskazują na bezpośredni wpływ natężenia promieniowania świetlnego na szybkość transkrypcji genów klastra *mcy* u rodzajów takich jak *Microcystis* i *Planktothrix*. Udokumentowano wzrost poziomu transkrypcji przy wysokim natężeniu światła ($68 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) oraz spadek transkrypcji gdy natężenie światła było niskie ($16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lub w ciemności. Istnieją również dowody, że w warunkach wysokiego natężenia promieniowania słonecznego, oraz w szczególności promieniowania UVB szczepy produkujące mikrocystyny wygrywają konkurencję ze szczepami nietoksycznymi (Ding i wsp. 2013, Paerl i Otten 2013). Innym czynnikiem mogącym wpływać na zwiększone wytwarzanie mikrocystyn jest limitacja azotowa w środowisku, chociaż w tym wypadku zależności nie zawsze są wyraźne i mogą zależeć od możliwości wiązania azotu atmosferycznego przez komórki cyjanobakterii (Long i wsp. 2001, Downing i wsp. 2005a).

Wszystkie te informacje wskazują, że chociaż mikrocystyny uważane są za metabolity wtórne cyjanobakterii, posiadają jednak właściwości istotnych i niezbędnych związków wewnątrzkomórkowych, mogących m. in. odgrywać rolę ochronną przed nadmierną intensywnością światła lub stresem oksydacyjnym (Orr i Jones 1998, Zilliges i wsp. 2011).

1.3.1.2. Alkaloidy

Cylindrospermopsyny to cykliczne alkaloidy guanidynowe, zaliczane do hepatotoksyn, lecz wykazujące zupełnie inny mechanizm toksyczności, niż cykliczne peptydy (Rys. 3). Toksyny te u zwierząt hamują syntezę białek i powodują uszkodzenia DNA (Metcalf i Codd 2004). Działają wolniej niż mikrocystyny (efekty zatrucia są widoczne w ciągu kilku dni) i powodują uszkodzenia głównie wątroby, ale też innych narządów (nerek, serca, płuc, jelit, śledziony czy grasicy) (Chorus i Bartram 1999, Metcalf i Codd 2004). Taksony sinic, które mogą wytwarzać cylindrospermopsyny to *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Raphidiopsis*, *Umezakia* spp. (Harada i wsp. 1994, Banker i wsp. 1997, Hawkins i wsp. 1997). Główny producent cylindrospermopsyny - *Cylindrospermopsis raciborskii*, występuje przede wszystkim w regionach tropikalnych i subtropikalnych, chociaż w ostatnich kilkudziesięciu latach następuje szybka jego ekspansja w wodach klimatu umiarkowanego, np. w zachodniej i środkowej części Europy (Wiedner 2007), a także w Polsce (Kokociński i wsp. 2011).



Rysunek 3. Budowa cząsteczki cylindrospermopsyny.

1.3.2. Neurotoksyny

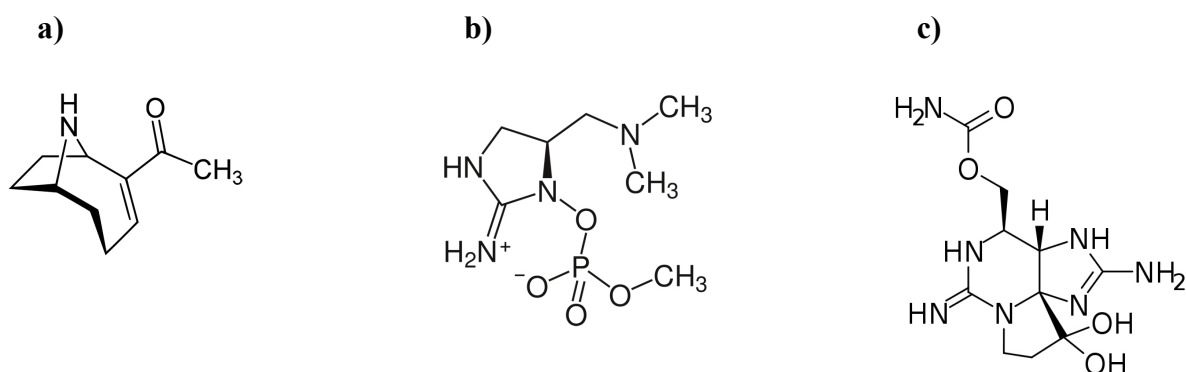
1.3.2.1. Alkaloidy - anatoksyna-a, anatoksyna-a(S) i saksitoksyna

Anatoksyna-a, o budowie aminy drugorzędowej, wytwarzana jest przez cyjanobakterie z rodzajów takich jak *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* i *Planktothrix* (Rys. 4a). Jej działanie toksyczne polega na wiązaniu się z receptorami acetylocholinowymi w synapsach nerwowych i skutkuje paraliżem mięśni oddechowych, a w skrajnych przypadkach

śmiercią przez uduszenie (Metcalf i Codd 2004).

Cząsteczka anatoksyny-a(S), o budowie estru fosforanowego cyklicznej N-hydroksyguanidyny wykazuje u kręgowców podobne działanie jak anatoksyna-a, hamując działanie esterazy acetylocholinowej w synapsach (Rys. 4b) (Chorus i Bartram 1999). Produkowana jest głównie przez różne gatunki z rodzaju *Dolichospermum* (Matsunaga i wsp. 1989, Henriksen i wsp. 1997).

Saksitoksyny znane są głównie z występowania w tzw. „red tides”, „czerwonych zakwitach” powodowanych przez bruzdnice, w których woda przybiera barwę czerwoną lub brązową. Mogą być jednak także wytwarzane przez sinice z rodzajów *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum* i *Lyngbya* (Rys. 4c) (Chorus i Bartram 1999). Podlegają bioakumulacji, dlatego główną drogą zatrucia u kręgowców jest spożycie morskich mięczaków, skąd wywodzi się nazwa jednostki chorobowej wywołanej saksitoksynami - PSP (ang. paralytic shellfish poisoning). Toksyny te blokują kanały sodowe w aksonach, zaburzając przesyłanie sygnałów nerwowych, co skutkuje paraliżem mięśni i w skrajnych przypadkach śmiercią (Metcalf i Codd 2004).

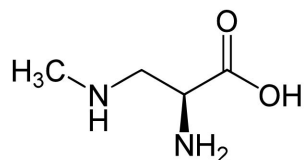


Rysunek 4. Budowa cząsteczek neurotoksyn z grupy alkaloidów: a) anatoksyna-a, b) anatoksyna-a(S), c) saksitoksyna.

1.3.2.2. Niebiałkowy aminokwas – BMAA

Innym przykładem neurotoksyny jest aminokwas β -metylamino-L-alanina (BMAA) (Rys. 5), który może być wytwarzany przez szerokie spektrum taksonów cyjanobakterii, w tym przez pikocyjanobakterie (Cox i wsp. 2005). BMAA jest wolno działającą toksyną, podlegającą bioakumulacji, która powoduje zaburzenia w strukturze trzeciorzędowej białek, a także może

zakłócać działanie neuronowych receptorów (Jakubowska i Szelaż-Wasielewska 2015). Jej działanie może powodować choroby neurodegeneracyjne, takie jak stwardnienie zanikowe boczne (ALS), parkinsonizm (PDC) (Cox i wsp. 2005, Chiu i wsp. 2013).

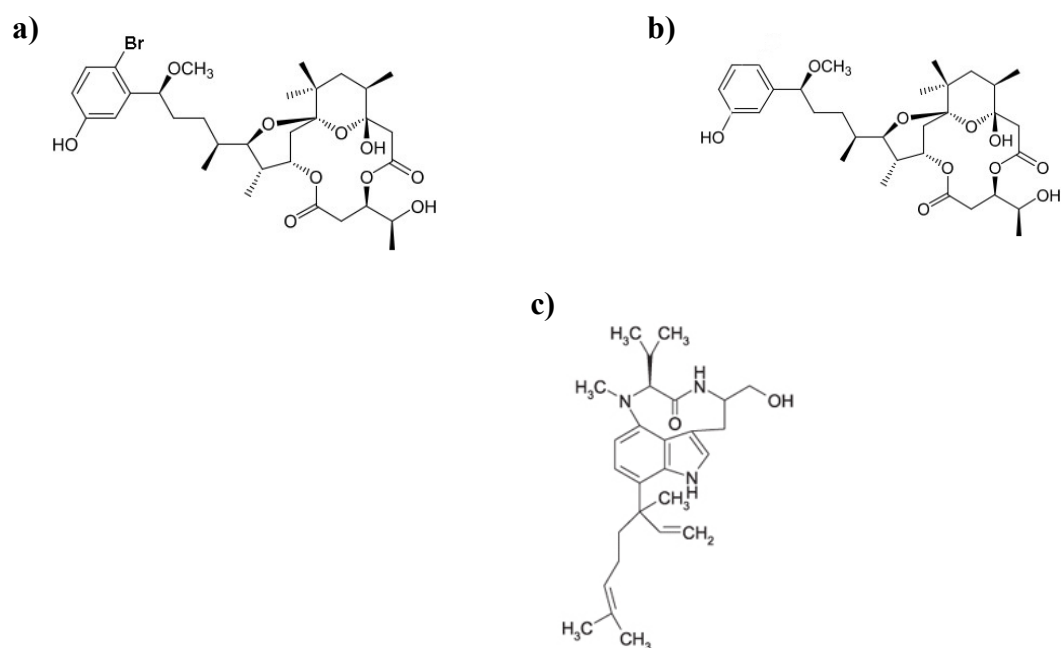


Rysunek 5. Budowa toksyny BMAA.

1.3.3. Dermatotoksyny

1.3.3.1. Alkaloidy

Morskie cyjanobakterie z rodzajów takich jak *Lyngbya* czy *Schizothrix* produkują toksyny wywołujące zapalenie skóry. Aplysiatoksyny, debromoaplysiatoksyny czy lyngbyatoksyny (Rys. 6), oprócz działania podrażniającego skórę, mogą też powodować zapalenia układu pokarmowego, a także działać jako promotory nowotworów (Chorus i Bartram 1999).



Rysunek 6. Budowa cząsteczek dermatotoksyn: a) aplysiatoksyny, b) debromoaplysiatoksyny, c) lyngbyatoksyny.

1.3.3.2 Lipopolisacharyd

Lipopolisacharyd (LPS) jest składnikiem ścian komórkowych bakterii gram-ujemnych, w tym cyjanobakterii. U ssaków może wywoływać podrażnienia skóry i reakcje alergiczne (Chorus i Bartram 1999).

1.3.4. Inne metabolity cyjanobakterii

Oprócz toksyn działających na organizmy kręgowców, sinice wytwarzają też cały szereg związków, które mogą oddziaływać na inne organizmy. Zaliczamy do nich na przykład mikrowiridyny, anabaenopeptopiny, mikrogininy, cyjanobakteriny, fisherreliny i nostocyklamidy (Metcalf i Codd 2004). Związki te mogą mieć działanie antywirusowe, antibakteryjne, antygrzybowe czy hamować rozwój organizmów zooplanktonowych. Wiele z tych substancji potencjalnie może mieć zastosowanie w medycynie (Chorus i Bartram 1999).

1.3.5. Zatrucia cyjanotoksynami u ludzi i zwierząt

Większość opisywanych dotychczas zatruc u zwierząt i ludzi dotyczy hepatotoksyn, które są najszerzej rozpowszechnione w wielu środowiskach wodnych i mogą być produkowane przez różnorodne taksony cyjanobakterii. Pierwsze udokumentowane przypadki zatrucia zwierząt toksynami sinicowymi zdarzyły się w XIX wieku w Australii i dotyczyły bydła i psów pijących wodę z jeziora, w którym występował zakwit cyjanobakterii (Francis 1878). Od tego czasu opisywano przypadki zatruc zwierząt na całym świecie, zarówno w obu Amerykach, Europie, Azji i Australii (Wood 2016). Zatrucia, w dużej mierze śmiertelne, dotyczą głównie bydła, a także psów, ptaków i ryb (Wood 2016), choć odnotowano też pojedyncze przypadki dotyczące na przykład pszczół, nietoperzy, żyraf czy wydr (May i McBarron 1973, Pybus i wsp. 1986, Harding i Paxton 2001, Miller i wsp. 2010).

Potwierdzone literaturowo przypadki zatruc ludzi notuje się od lat 30 XX wieku. Problemy zdrowotne pojawiające się po wypiciu wody zanieczyszczonej toksynami sinicowymi obserwowano w m. in. USA, Zimbabwe, Australii, Brazylii, Szwecji i na Filipinach (Miller i Tisdale 1931, Veldee 1931, Zilberg 1966, Dean i Jones 1972, Lippy i Erb 1976, Byth 1980, Bourke i wsp. 1983, Falconer i wsp. 1983, Hawkins i wsp. 1985, Teixeira i wsp. 1993, Annadotter i wsp. 2001) i w większości przypadków dotyczyły one źle uzdatnianej wody

pitnej, której ujęcia znajdowały się w zbiornikach wodnych z występującymi zakwitami cyjanobakterii. O wiele częstsze są doniesienia o problemach zdrowotnych w następstwie kontaktu z zanieczyszczoną toksynami wodą w czasie rekreacji czy uprawiania sportów wodnych. Udokumentowane przypadki notowano w USA, Kanadzie, Argentynie, Australii, Wielkiej Brytanii, Holandii i Finlandii (Heise 1949, Dillenberg i Dehnelt 1960, Billings 1981, Carmichael i wsp. 1985, Pearson i wsp. 1990, Turner i wsp. 1990, Soong i wsp. 1992, Williamson i Corbett 1993, van Hoof 1994, Pizzolon i wsp. 1999, Rapala i wsp. 2005, Giannuzzi i wsp. 2011, Trevino-Garrison i wsp. 2015).

Śmiertelne przypadki ekspozycji na cyjanotoksyny wśród ludzi są dość rzadkie, lecz jeśli wystąpią, często dotyczą jednocześnie dużej liczby osób. W 1988 roku odnotowano śmierć 88 osób w Bahia w Brazylii, a w 2001 roku około 100 przypadków śmiertelnych w Kenii. W obu sytuacjach nie znaleziono innych przyczyn zachorowania, niż kontakt z zanieczyszczoną toksynami sinicowymi wodą pitną lub wodą jeziorną (Teixeira i wsp. 1993, Codd i wsp. 2005). Najlepiej udokumentowany przypadek śmiertelnego zatrucia cyjanotoksynami miał miejsce w 1996 roku w klinice dializacyjnej w Caruaru w Brazylii. Woda używana w klinice okazała się być niedostatecznie oczyszczona, w wyniku czego mikrocyстина z grupy hepatotoksyn została wprowadzona dożylnie do krwioobiegu wielu pacjentów. Potwierdzono, że ponad 50 osób otrzymało dawkę śmiertelną. W wyniku tego zdarzenia poważnie ucierpiało 126 osób, a liczba śmiertelnych przypadków ostatecznie wyniosła 76 (Carmichael i wsp. 2001, Azevedo i wsp. 2002, Metcalf i Codd 2004). Natomiast prawdopodobny śmiertelny przypadek zatrucia neurotoksyną – anatoksyną-a, opisano w Wisconsin w USA. Nastoletni chłopiec zmarł z powodu nagłego zatrzymania pracy serca po tym, jak pływał w stawie z gęstym zakwitem cyjanobakterii (Behm 2003, Weirich i Miller 2014).

Toksyny sinic mogą też działać w dłuższej skali czasowej i powodować choroby u ludzi i zwierząt narażonych na działanie niskich stężeń przez długi czas. Przykładowo w regionie południowo-wschodnich Chin w ostatnich kilkudziesięciu latach ponadprzeciętnie często występuje rak wątroby. Badania wskazują, że u ludzi, którzy piją wodę zanieczyszczoną mikrocystynami, choroba rozwija się częściej, ponieważ toksyny te działają również jako promotory nowotworów. W tym regionie występują jednak także inne czynniki sprzyjające powstawaniu raka wątroby, więc rola mikrocystyn nie jest jednoznacznie udowodniona (Metcalf i Codd 2004). Innym przykładem choroby rozwijającej się w wyniku długotrwałej ekspozycji na toksynę sinicową (BMAA z grupy neurotoksyn) jest stwardnienie zanikowe

boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS). W populacjach ludzi na pacyficznej wyspie Guam, oraz na niektórych obszarach Bliskiego Wschodu udowodniono związek pomiędzy zwiększoną częstotliwością występowania tej choroby a ekspozycją na BMAA (Murch i wsp. 2004, Cox i wsp. 2009). Podobne zależności obserwowane są również w niektórych regionach Ameryki Północnej oraz na południowym wybrzeżu Francji (Masseret i wsp. 2013).

1.4. Degradacja mikrocystyn w środowiskach naturalnych

Ze względu na cykliczną budowę cząsteczki mikrocystyny, oraz posiadanie kilku bardzo rzadkich aminokwasów, te najszerzej rozpowszechnione toksyny sinicowe są niezwykle odporne na degradację. Cząsteczki pozostają toksyczne nawet po gotowaniu wody, w której są rozpuszczone (Chorus i Bartram 1999). W zamkniętych układach, na przykład w stacjach uzdatniających wodę, do pozbycia się mikrocystyn mogą być wykorzystywane związki chemiczne. Chlorowanie lub ozonowanie unieszkodliwia toksynę, utleniając aminokwas Adda, dzięki działaniu reaktywnych form tlenu, np. rodników hydroksylowych (Bourne i wsp. 2006, de la Cruz i wsp. 2011). Innym sposobem degradacji może być ultrasonikacja. Wyniki badań wskazują, że trwająca 180 sekund ekspozycja na ultradźwięki o częstotliwości 60 kHz prowadzi do degradacji ponad 50% toksyny (de la Cruz i wsp. 2011). Mikrocystyny rozkładają się także poddane działaniu intensywnego promieniowania UV, głównie UVC (238-240 nm) (Tsuiji i wsp. 1995).

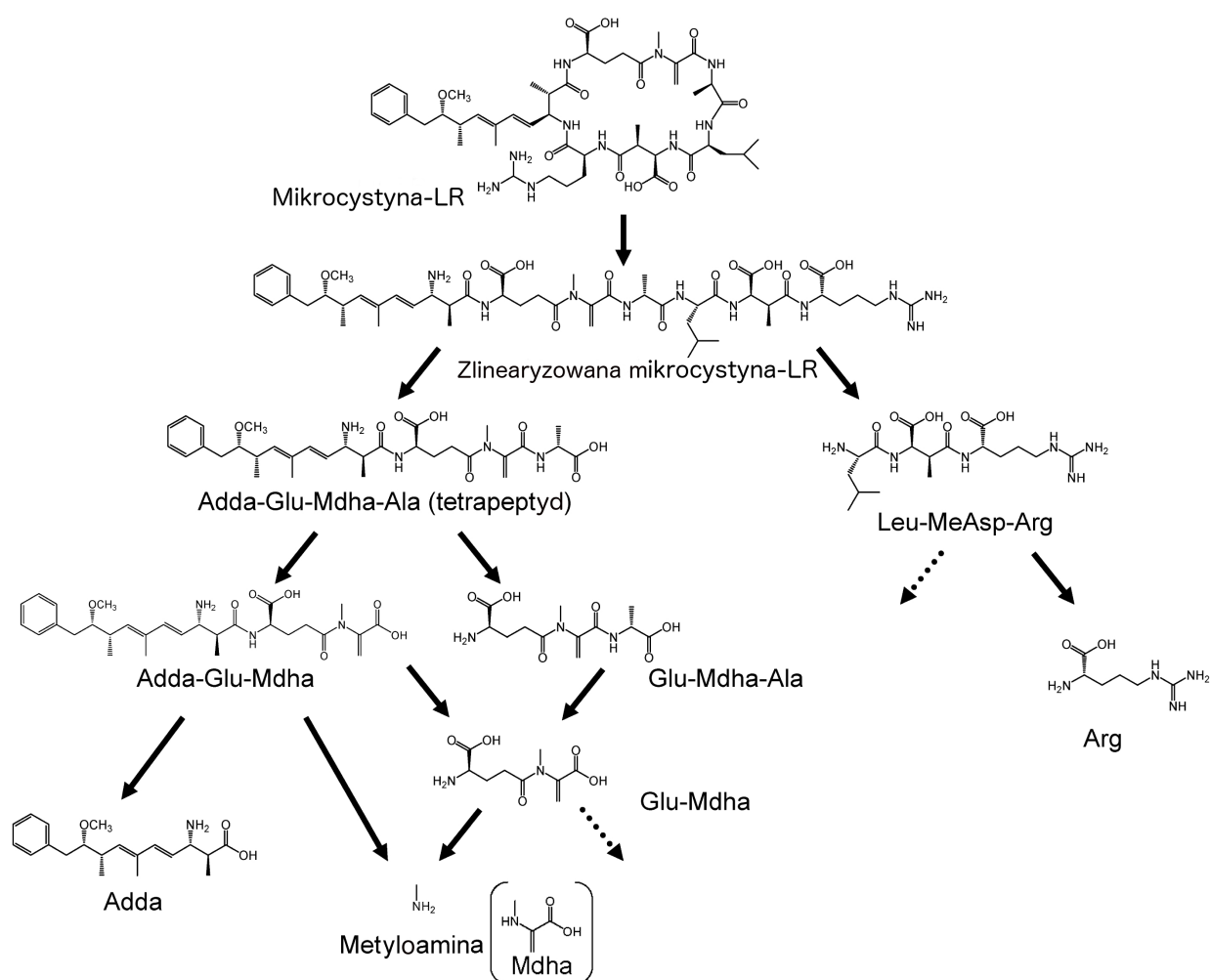
W środowisku naturalnym związki te ulegają degradacji na dwa sposoby: poprzez fotolizę oraz biologiczny rozkład. Promieniowanie słoneczne jest jednak przeważnie nieefektywne, ponieważ jego widmo składa się z fal o długości wyższej niż 280 nm. Szybkość fotodegradacji może zwiększać obecność komórkowych barwników rozpuszczalnych w wodzie, takich jak fikobiliproteiny, jak również substancji humusowych, które absorbują światło przy długości fali 290 nm i tworzą rodniki ułatwiające degradację (Gągała i Mankiewicz-Boczek 2012). Jednak nawet w takich warunkach całkowity rozkład toksyn może trwać, w zależności od stężenia od kilku dni do nawet kilku tygodni (Tsuiji i wsp. 1994, Welker i Steinberg 1999).

Najważniejszym sposobem usuwania mikrocystyn z naturalnych ekosystemów jest biodegradacja. Zespoły heterotroficznych mikroorganizmów mogą wykorzystywać

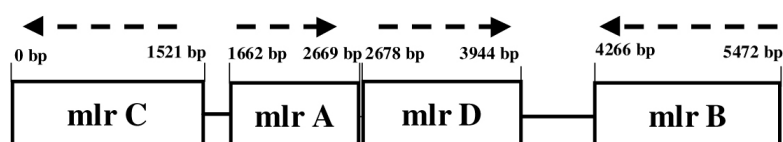
mikrocystyny jako źródło węgla (de la Cruz i wsp. 2011). Bakterie zdolne do degradacji mikrocystyny znajdowano w różnych środowiskach - wodach rzecznych i jeziornych, jak również w osadach dennych (Rapala i wsp. 2005). Obecnie bakterie środowiskowe zdolne do degradacji mikrocystyn są intensywnie badane, ponieważ z ich wykorzystywaniem do oczyszczania zbiorników wodnych z toksyn sinicowych wiązane są duże nadzieje.

Pierwszą bakterią o udowodnionej zdolności do degradacji mikrocystyn była *Sphingomonas* sp. ACM-3962 (Bourne i wsp. 1996, Bourne i wsp. 2001). Następnie opisywano kolejne bakterie, takie jak *Sphingopyxis* i *Novosphingobium* spp., należące do rodziny *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*), również wykazujące aktywność degradacyjną (Ho i wsp. 2007b, Jiang i wsp. 2011). Bakterie z tej rodziny degradują mikrocystyny w sposób opisany przez Bourne i wsp. (2001) (Rys. 7) i uzupełniany następnie przez innych badaczy o dokładny opis produktów rozkładu oraz charakterystykę uczestniczących w nim enzymów (Hashimoto i wsp. 2009, Dziga i wsp. 2012, Dziga i wsp. 2016). Jest to do tej pory jedyny w pełni opisany szlak rozkładu mikrocystyn. Od strony molekularnej za degradację odpowiedzialny jest klaster czterech genów *mlr* (*mlrABCD*) (Rys. 8).

Pierwszym i najważniejszym enzymem szlaku jest mikrocystynaza (metalopeptydaza), kodowana przez gen *mlrA*, katalizująca otwarcie cyklicznej cząsteczki poprzez hydrolizę wiązania peptydowego Arg-Adda (w mikrocystynie-LR). Zlinearyzowana forma mikrocystyny jest 160 razy mniej toksyczna niż jej cykliczna forma (Bourne i wsp. 2001, de la Cruz i wsp. 2011). Gen *mlrB* koduje enzym hydrolizujący wiązanie peptydowe Ala-Leu, a *mlrC* peptydazę odpowiedzialną za dalszy rozkład mniejszych peptydów. Natomiast gen *mlrD* koduje białko transporterowe przenoszące mikrocystynę lub produkty jej degradacji z i do komórki (Bourne i wsp. 2001, Hashimoto i wsp. 2009).



Rysunek 7. Szlak degradacji mikrocytyn u bakterii z rodziny *Sphingomonadaceae* (zmienione za Hashimoto i wsp. 2009).



Rysunek 8. Budowa klastra genów *mlr* u wybranych taksonów cyjanobakterii (za Bourne i wsp. 2001).

Wiadomo, że szlak degradacji opisany przez Bourne i wsp. (2001) nie jest jedynym istniejącym w przyrodzie sposobem bakteryjnego rozkładu mikrocystyn. Liczne publikacje wskazują na istnienie innych niż rodzina *Sphingomonadaceae* grup mikroorganizmów mogących rozkładać mikrocystyny np. *Pseudomonas* spp. (Takenaka i Watanabe 1997, Ji i wsp. 2009), *Ralstonia solanacearum* (Yan i wsp. 2004), *Paucibacter toxinovorans* (Rapala i wsp. 2005), *Burkholderia* sp. (Lemes i wsp. 2008), *Methylobacillus* sp. (Hu i wsp. 2009), *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. (Manage i wsp. 2009), *Morganella morganii* (Eleuterio i Batista 2010), *Microbacterium* sp., *Rhizobium gallicum* (Ramani i wsp. 2012), oraz bakterii probiotycznych takich jak *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* (Nybom i wsp. 2007). Żadna z tych bakterii nie posiada genów *mlr*, a sposób degradacji toksyn nie jest dotychczas poznany.

Do niedawna uważano jednak, że to taksony należące do *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*) stanowią główną grupę bakterii degradujących mikrocystyny. W świetle nowych metagenomowych badań bakterioplanktonu (np. z jeziora Erie, USA) można przypuszczać, że aktywność degradacyjna jest o wiele szerzej rozpowszechniona wśród bakterii, niż do tej pory sądzono. Mou i wsp. (2013) odkryli, że w jednym ekosystemie jeziornym zdolność rozkładu mikrocystyn mogą wykazywać bakterie aż 89 różnych rzędów, należące do *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia*. U żadnego z tych taksonów nie odkryto homologów genów *mlr*. Natomiast bakterie należące do *Sphingomonadales* stanowiły tylko około 1% wszystkich bakterii obecnych w wodzie podczas zakwitu sinic. Zaproponowano hipotezę, w której jednym z alternatywnych szlaków degradacji mikrocystyn może być ten związany z metabolizmem ksenobiotyków, gdyż geny odpowiedzialne za ten proces były nadreprezentowane w próbach, w których zachodził rozkład toksyn (Mou i wsp. 2013). Można jednak sądzić, że istnieją również kolejne, nie poznane dotąd szlaki degradacji mikrocystyn (Dziga i wsp. 2013).

1.5. Metody biologii molekularnej w badaniach cyjanobakterii w środowiskach naturalnych

Rozwój metod biologii molekularnej ma ogromny wpływ na zrozumienie potencjału biologicznego, relacji z czynnikami środowiskowymi czy ekologicznych zależności w obrębie populacji mikroorganizmów. Badanie genów markerowych lub innych charakterystycznych

sekwencji pozwala na sprawdzenie występowania w populacji określonych cech, szlaków metabolicznych, czy konkretnych grup taksonomicznych. W porównaniu do klasycznych metod, które często wymagają izolacji czystych szczepów i testowania wybranej cechy np. metodami biochemicznymi, metody molekularne są szybkie, a ich zaletą jest duża czułość i powtarzalność. Badanie obecności określonych genów może ujawniać potencjał do występowania poszukiwanych cech, lub, jeśli badamy RNA, ujawniać rzeczywistą ekspresję tych genów w komórkach.

Pierwszym krokiem zarówno w prostych, jak i niezwykle zaawansowanych metodach molekularnych jest zwykle łańcuchowa reakcja polimerazy - PCR (ang. polymerase chain reaction), która pozwala na powielenie wybranego fragmentu sekwencji DNA. Krytycznym etapem w tej procedurze jest dobór odpowiednich starterów reakcji, od którego zależy jakie informacje uzyskamy dzięki amplifikacji. Startery mogą zostać zaprojektowane tak, aby wykrywać obecność konkretnego fragmentu DNA tylko u wybranego taksonu, lub też odwrotnie – amplifikować dany fragment w szerokiej grupie taksonomicznej np. *Cyanobacteria*. W badaniach środowiskowych szczególnie ważny jest odpowiedni dobór i przetestowanie używanych starterów pod kątem ich specyficzności dla wybranych grup taksonomicznych, ze względu na obecność w próbkach ze środowiska materiału genetycznego ogromnej liczby różnych organizmów.

PCR pozwala na uzyskanie podstawowej informacji o występowaniu lub braku szukanego fragmentu DNA w badanej próbce. Jednak już nawet sama ta metoda może dostarczyć użytecznych dowodów o obecności genów odpowiedzialnych za konkretne procesy, bądź o obecności poszukiwanych taksonów, w przypadku użycia specyficznych dla danego taksonu starterów. W przypadku amplifikacji mieszaniny fragmentów DNA z wielu różnych taksonów, dalsze procedury pozwalają na ich rozdzielenie lub identyfikację. Istnieje cała gama metod umożliwiających stworzenie “genetycznego odcisku palca” (ang. genetic fingerprint) danej populacji, dzięki którym możemy wizualizować i porównywać np. zmienność populacji w czasie (Wilmotte i wsp. 2017). Technika RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism) rozdziela na żelu fragmenty DNA trawione enzymami restrykcyjnymi (Bolch i wsp. 1996), RAPD (ang. random amplified polymorphic DNA) rozdziela fragmenty amplifikowane za pomocą starterów będących mieszaniną krótkich nukleotydów (Palinska i wsp. 2011), natomiast RISA (ang. ribosomal intergenic spacer analysis) pozwala na rozdzielenie w czasie elektroforezy amplifikowanych rybosomalnych sekwencji międzygenowych (Toruńska 2012). Jedną z metod często stosowanych w ekologii

molekularnej, pozwalających na rozdzielenie mieszaniny zamplifikowanych fragmentów DNA, jest DGGE, czyli elektroforeza w żelu z gradientem czynnika denaturującego (ang. denaturing gradient gel electrophoresis). Dzięki rozdzielaniu na żelu fragmentów DNA nie różniących się długością, ale o różnej sekwencji, technika ta pozwala na badanie różnorodności taksonomicznej w populacji np. cyjanobakterii, ale także odróżniania poszczególnych organizmów posiadających konkretne cechy, np. wytwarzanie toksyn (Jasser i wsp. 2017). Inną przydatną metodą badania różnorodności w próbkach środowiskowych są diagnostyczne mikromacierze. Tego typu macierz zawiera sondy (krótkie sekwencje nukleotydowe), zazwyczaj obejmujące tylko jeden lub ewentualnie kilka genów, lecz pozwalające wykryć wiele różnych rodzajów lub gatunków w badanej populacji (Burja i wsp. 2003, Rantala-Ylinen i wsp. 2017).

Natomiast jedyną metodą ilościową, umożliwiającą określenie ilości kopii badanego fragmentu DNA w próbce, jest PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR, inna nazwa qPCR – ang. quantitative PCR). qPCR pozwala na zbadanie dokładnej liczebności komórek danego taksonu w próbce środowiskowej, jak również sprawdzenie liczebności komórek posiadających określone cechy. W procedurze qPCR, dzięki użyciu barwników interkalujących z DNA, lub sond oligonukleotydowych, każdym cyklu mierzony jest fluorescencyjny sygnał, pozwalający na oszacowanie w czasie rzeczywistym przyrostu ilości badanych cząsteczek DNA w reakcji.

Techniki umożliwiające poznanie sekwencji badanych fragmentów DNA są kolejnymi użytecznymi narzędziami w badaniach środowiskowych. Klasyczna metoda Sangera (Sanger i wsp. 1977) pozwala na zbadanie sekwencji genów, jednak wymaga, aby sekwencjonowany materiał był jednorodny, a nie był mieszaniną fragmentów DNA pochodzących od różnych taksonów. Uzyskane sekwencje dzięki istniejącym bazom danych (np. GenBank) i narzędziom bioinformatycznym mogą posłużyć do określania taksonomii, badań filogenetycznych lub porównywania sekwencji danych genów u różnych taksonów.

Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. next generation sequencing) było przełomowym odkryciem dla mikrobiologii środowiskowej. Technika ta posiada znaczącą przewagę nad klasycznymi metodami, ponieważ umożliwia jednoczesne sekwencjonowanie ogromnej liczby cząsteczek DNA, oraz dodatkowo nie wymaga jednorodności sekwencjonowanego materiału. W konsekwencji dzięki jednej reakcji można poznać całkowitą strukturę taksonomiczną populacji. Metoda, mimo że obecnie nadal dość kosztowna, jest znacznie szybsza i efektywniejsza niż klasyczne metody mikroskopowe,

czy tradycyjne metody molekularne. Należy jednak pamiętać, że generuje ona ogromne ilości danych i wymaga zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych oraz odpowiednich baz danych z sekwencjami referencyjnymi (Deng i wsp. 2017).

Markery molekularne stosowane w mikrobiologii środowiskowej to przede wszystkim fragmenty pozwalające na identyfikację taksonomiczną mikroorganizmów w naturalnych populacjach. Najczęściej stosowany w tym celu jest gen 16S rRNA, który zawiera zarówno konserwowane, jak i bardziej zmienne domeny, więc może być używany do klasyfikacji na różnych poziomach systematycznych, jednak zwykle nie pozwala na odróżnianie sekwencji poszczególnych gatunków z danego rodzaju. Ponadto, w porównaniu do innych genów metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping genes), 16S rRNA jest odporny na działanie horyzontalnego transferu genów (Wilmotte i wsp. 2017). Niezwykle ważny jest też fakt, że ogromna ilość tych sekwencji zdeponowana jest obecnie w bazach danych, stanowiąc materiał porównawczy dla nowo otrzymywanych sekwencji. Bardziej szczegółowe rozróżnianie pomiędzy blisko spokrewnionymi taksonami możliwe jest dzięki innym markerom, wśród których dla cyjanobakterii najczęściej stosowane są 16S-23S ITS – region między genami kodującymi rybosomalne podjednostki, lub PC-IGS – region między genami *cpcA* i *cpcB* w operonie fikocyjaniny. Inna grupa molekularnych markerów to takie, które mogą wskazywać na posiadanie określonych cech lub funkcji. Dla cyjanobakterii często stosowanymi genami markerowymi są te wskazujące na możliwość wytwarzania toksyn, takie jak geny z klastra *mcy* dla mikrocystyn czy *nda* dla nodularyn.

2. Cele badań i hipotezy badawcze

Celem pracy była kompleksowa analiza zespołów cyjanobakterii i bakterii degradujących cyjanotoksyny, oraz zależności środowiskowych na nie wpływających, w wybranych jeziorach należących do systemu Wielkich Jezior Mazurskich (WJM), z zastosowaniem metod biologii molekularnej.

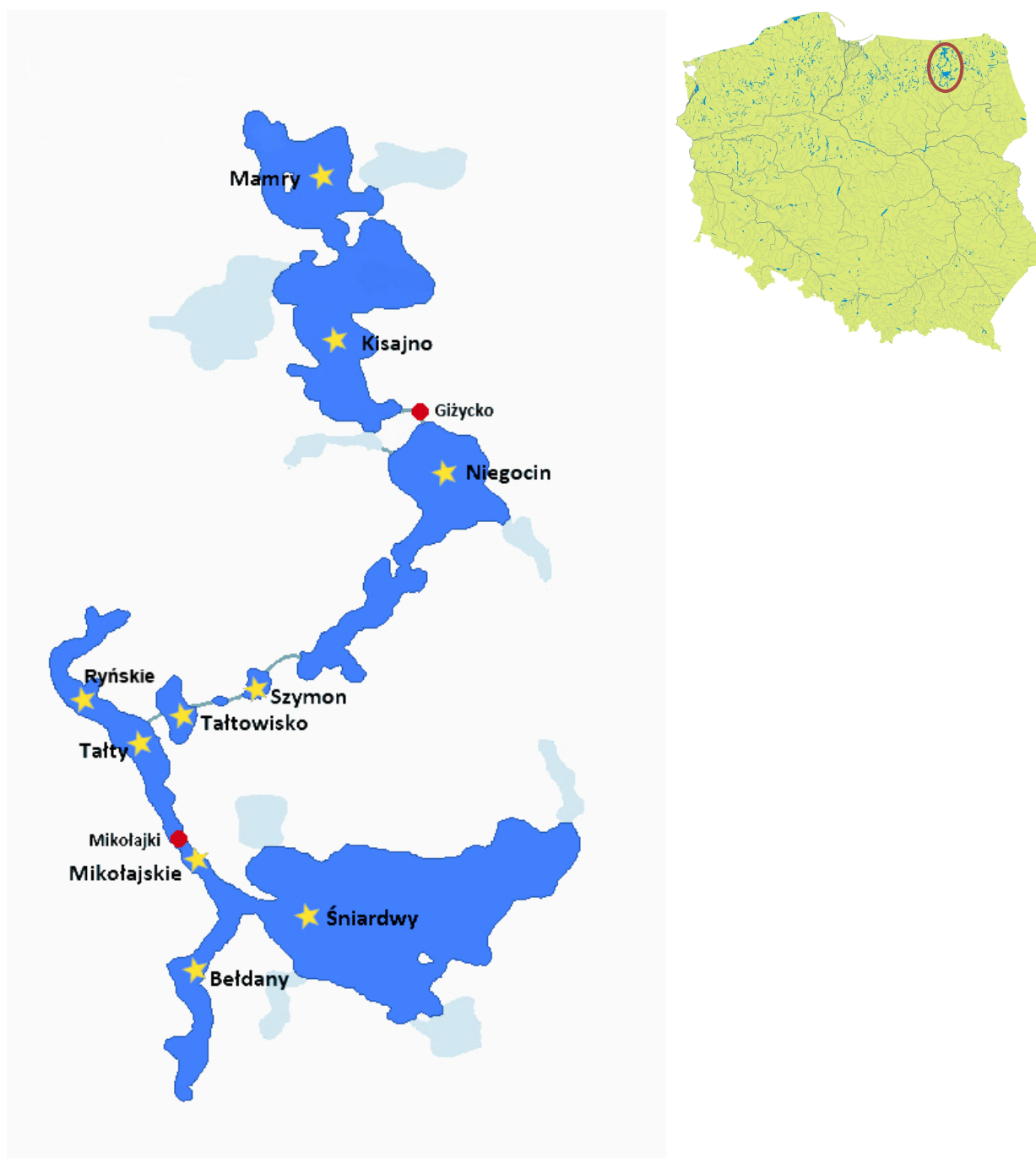
2.1. Testowane hipotezy badawcze

- A. Czy i w jaki sposób stan troficzny oraz czynniki środowiskowe kształtują występowanie, strukturę i różnorodność zespołów cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich.
- B. Czy degradacja mikrocystyn przez bakterie w badanych jeziorach mazurskich jest zależna od podobnych czynników środowiskowych, które wpływają na występowanie zespołów cyjanobakterii.

2.2. Szczegółowe cele badań

- 1) Rozpoznanie różnic i podobieństw w składzie taksonomicznym cyjanobakterii w wybranych WJM, oraz określenie czynników wpływających na kształtowanie się zespołów cyjanobakterii w czasie i przestrzeni;
- 2) Określenie jakie potencjalnie toksyczne taksony sinic mogą występować w badanych jeziorach;
- 3) Zbadanie jaki udział w potencjalnie toksycznych taksonach cyjanobakterii stanowią komórki wytwarzające toksyny;
- 4) Sprawdzenie, czy na podstawie badania udziału toksycznych genotypów w populacjach sinic można przewidywać występowanie toksycznych zakwitów;
- 5) Zbadanie czy w jeziorach mazurskich występują bakterie degradujące cyjanotoksyny oraz w jakich warunkach zachodzi biodegradacja mikrocystyn.

3. Teren badań



Rysunek 9. Kompleks Wielkich Jezior Mazurskich oraz umiejscowienie na mapie Polski. Gwiazdkami zaznaczono miejsca poboru próbek do badań.

Kraina Wielkich Jezior Mazurskich, wchodząca w skład Pojezierza Mazurskiego, zlokalizowana jest w północno-wschodniej części Polski (Rys. 9). Jest niezwykle cennym obszarem pod względem walorów przyrodniczych, jak również z punktu widzenia lokalnej gospodarki rybackiej. Podstawą gospodarki regionu jest jednak turystyka, w ostatnich latach Mazury odwiedza rocznie nawet ponad milion osób (dane GUS za 2014 rok).

System Wielkich Jezior Mazurskich obejmuje kilkanaście jezior o zróżnicowanej wielkości i genezie, połączonych naturalnie lub przy pomocy wybudowanych w XIX wieku kanałów. Region ten ukształtował się około 10-15 tysięcy lat temu w czasie zlodowacenia bałtyckiego i jest zaliczany do regionów młodoglacjalnych (Siuda 2008). Obszar Krainy Wielkich Jezior Mazurskich to 1732 km², z czego powierzchnia jezior zajmuje około 1/3.

System Wielkich Jezior Mazurskich można podzielić na 4 podstawowe kompleksy jeziorne: (1) wysunięty najbardziej na północ kompleks jeziora Mamry, (2) kompleks jezior i łączących je kanałów ciągnący się od jeziora Niegocin do jeziora Tałtowisko, (3) kompleks rynnowych jezior Ryńskie-Tałty-Mikołajskie-Beldany oraz (4) kompleks największego w Polsce jeziora Śniardwy.

Zlewnia systemu Wielkich Jezior Mazurskich leży w obszarze źródłowym dwóch rzek – Węgorapy na północy i Pisy na południu. Dział wodny położony jest w okolicach ujścia Kanału Giżyckiego do jeziora Kisajno (Mikulski 1966). System podzielony jest więc na dwie części – północną, do której należy kompleks jeziora Mamry i południową obejmującą pozostałe jeziora. Całkowita powierzchnia zlewni systemu Wielkich Jezior Mazurskich wynosi 3645 km², z czego ponad 80% (3030 km²) to zlewnia części południowej (Siuda 2008). Rzeka Pisa, która jest głównym odpływem z systemu Wielkich Jezior Mazurskich wpada rzeki Narew, która poprzez Zalew Zegrzyński łączy się z Wisłą. W Tabeli 2 zawarto podstawowe parametry morfometryczne charakteryzujące jeziora badane w niniejszej pracy.

Pomimo, że wszystkie jeziora systemu Wielkich Jezior Mazurskich są ze sobą połączone, to są one znacznie zróżnicowane pod względem trofii. Status troficzny badanych w niniejszej pracy jezior różnił się od mezotrofii do zaawansowanej eutrofii lub eu-/hypereutrofii. Parametry określające stan troficzny badanych jezior w latach 2011-2013 przedstawiono w Tabeli 3.

W składzie gatunkowym i biomasie fitoplanktonu w Wielkich Jeziorach Mazurskich bardzo często dominują cyjanobakterie (Bukowska i wsp. 2014, Napiórkowska-Krzebietke 2015). W badanych jeziorach występuje bardzo duża różnorodność taksonomiczna sinic,

pojawiają się gatunki różne morfologicznie, wiele z nich może również potencjalnie wytwarzać toksyny.

Tabela 2. Charakterystyka morfometryczna badanych jezior

Nazwa	Powierzchnia (ha)	Głębokość maks. (m)	Głębokość średnia (m)	Długość maks. (km)	Szerokość maks. (km)	Długość linii brzegowej (km)	Rodzaj jeziora
Mamry	2504	43,8	10	7,6	5,2	34	Jezioro morenowe
Kisajno	1896	25	8,4	8,5	3	50,1	Jezioro morenowe
Niegocin	2600	39,7	9,9	10,8	4,8	35	Jezioro morenowe
Szymon	154	2,9	1,1	1,9	1,4	5,8	Małe jezioro typu stawowego
Tałtowisko	327	39,5	14	4,4	1,6	11,5	Jezioro rynnowe
Ryńskie	671	20,2	13,5	7,1	1,9	27,7	Jezioro rynnowe
Tały	1160	50,8	14	12,5	1,8	31	Jezioro rynnowe
Mikołajskie	498	25,9	11,2	5,8	1,6	15,1	Jezioro rynnowe
Śniardwy	11340	23,4	5,8	22,1	13,4	97,2	Jezioro morenowe
Beldany	941	46	10	12,4	2,4	34,4	Jezioro rynnowe

Tabela 3. Stężenie chlorofilu_a, fosforu całkowitego (TP), widzialność krążka Secchi’ego (SD), oraz status troficzny badanych jezior. Wyniki stanowią średnią z pomiarów przeprowadzanych w miesiącach letnich (lipiec i sierpień) w latach 2011, 2012 i 2013.

Nazwa	Chlorofil _a (µg/l)	TP (µM/l)	SD (m)	Status troficzny
Mamry	7,9 ± 1,7	0,700 ± 0,167	2,7 ± 0,61	mezotrofia
Kisajno	8,4 ± 4,5	0,819 ± 1,164	2,8 ± 0,11	mezotrofia
Niegocin	15,8 ± 6,8	1,147 ± 0,092	1,8 ± 0,24	eutrofia
Szymon	13,9 ± 3,0	1,034 ± 0,204	1,5 ± 0,02	eutrofia
Tałtowisko	19,2 ± 11,0	0,959 ± 0,154	1,7 ± 0,03	eutrofia
Ryńskie	31,7 ± 10,8	1,312 ± 0,237	1,0 ± 0,23	eu-/hypereutrofia
Talty	25,8 ± 7,8	1,143 ± 0,217	1,4 ± 0,24	eutrofia
Mikołajskie	26,1 ± 3,2	1,206 ± 0,253	1,5 ± 0,33	eutrofia
Śniardwy	23,8 ± 9,3	1,248 ± 0,056	1,7 ± 0,20	eutrofia
Beldany	27,2 ± 6,8	1,172 ± 0,243	1,8 ± 0,45	eutrofia

4. Materiały i metody

4.1. Pobór próbek do analiz

Próbki wody i osadów dennych z badanych jezior były pobierane w trzech kolejnych sezonach badawczych, w latach 2011, 2012 i 2013.

Próbki do badań różnorodności populacji i składu taksonomicznego cyjanobakterii analizowanych wg metody DGGE pobierano z 8 jezior (Mamry, Kisajno, Niegocin, Tałtowisko, Tałty, Mikołajskie, Śniardwy, Beldany) w maju, lipcu, sierpniu i wrześniu w roku 2011 oraz w kwietniu, maju, lipcu i sierpniu w 2012 r.

Próbki do badań udziału toksycznych genotypów cyjanobakterii analizowanych metodą real-time PCR pobierano z 5 jezior (Mamry, Tałtowisko, Mikołajskie, Śniardwy, Ryńskie) w kwietniu, maju, lipcu i sierpniu w roku 2012 oraz w maju, lipcu, sierpniu i wrześniu w 2013 r.

Próbki do badań nad degradacją toksyn pobierano z 10 jezior (Mamry, Kisajno, Niegocin, Szymon, Tałtowisko, Ryńskie, Tałty, Mikołajskie, Śniardwy, Beldany) w maju, lipcu i sierpniu w 2013 r.

4.1.1. Pobór próbek wody

Próbki wody były pobierane za pomocą czepaka Bernatowicza ze strefy eufotycznej jeziora, której zasięg przyjmowano jako dwukrotność widzialności krążka Secchi'ego. Czerpakiem pobierano podpróbki co 1 metr głębokości, które następnie mieszano razem w jednakowych objętościach. W ten sposób uzyskana uśredniona próbka wody dla strefy eufotycznej jeziora była niezwłocznie transportowana do laboratorium w 5-litrowych plastikowych pojemnikach. Stanowiska poboru próbek pokazane są na mapie (Rys. 9).

4.1.2. Pobór próbek osadów dennych

Próbki osadów dennych były pobierane za pomocą czepaka w tych samych miejscach, co próbki wody. Osad umieszczano w plastikowych pojemnikach i niezwłocznie transportowano do laboratorium. Miejsca poboru próbek pokazane są na mapie (Rys. 9).

4.2. Przygotowanie próbek do analiz i ich przechowywanie

4.2.1. Próbki do analiz molekularnych

Z próbek wody materiał do badań molekularnych uzyskiwano poprzez przesączenie 250 ml próbki przez filtr poliwęglanowy o średnicy porów 0,2 μm . Filtry z osadzonym sestonem umieszczano w sterylnych probówkach typu Eppendorf 1,5 ml, zamrażano i przechowywano w temperaturze -30 lub -80 °C do czasu dalszych analiz. Próbki osadów dennych umieszczano w sterylnych probówkach typu Falcon 50 ml, zamrażano i przechowywano w temperaturze -30 lub -80 °C do czasu dalszych analiz.

4.2.2. Próbki do badania stężenia mikrocystyn

Do badania stężenia toksyn wykorzystywano przesącz przez filtr o średnicy porów 0,2 μm , pozostały po filtrowaniu próbek wody do analiz molekularnych. Przesączoną wodę zamrażano w sterylnych probówkach typu Falcon 15 ml i przechowywano w temperaturze -30 °C do czasu dalszych analiz.

4.2.3. Próbki do mikroskopowej analizy składu taksonomicznego i biomasy fitoplanktonu

W celu utrwalenia próbki do 500 ml świeżo pobranej wody jeziornej dodawano formaldehyd (końcowe stężenie 1,5%) oraz płyn Lugola (do osiągnięcia ciemnożółtego koloru próbki). Próbki przechowywano w ciemności w temperaturze 4 °C do czasu dalszych analiz.

4.2.4. Próbki do analiz chemicznych

Próbki wody do analiz stężenia fosforu i azotu umieszczano w 500 ml plastikowych butelkach, zamrażano i przechowywano w temperaturze -30 °C do czasu dalszych analiz. Próbki do analizy stężenia rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) uzyskiwano poprzez przesączenie wody jeziornej przez filtr poliwęglanowy o średnicy porów 0,2 μm . Próbki zamrażano i przechowywano w temperaturze -30 °C do czasu dalszych analiz.

4.3. Analizy molekularne

4.3.1. Izolacja całkowitego DNA

DNA z próbek wody jeziornej było izolowane za pomocą zestawu do izolacji DNA z gleby (GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit, EURx) zgodnie z instrukcją producenta, z modyfikacjami. Zestaw ten zawiera odczynniki, które pomagają usunąć z roztworu związki często występujące w materiale środowiskowym (np. kwasy humusowe), których obecność może przeszkadzać w analizach molekularnych. Zamrożone filtry z sestonem z próbek wody jeziornej cięto sterylnymi nożyczkami na małe kawałki, które umieszczano w próbówce zawierającej roztwór lizujący komórki oraz kulki szklane, umożliwiające lepszą homogenizację próbki. Probówki wytrząsano przez 10 minut w pozycji poziomej na woretku, przy maksymalnej prędkości wytrząsania. Następnie postępowano zgodnie z protokołem producenta. DNA z roztworu było wiązane do złoża w minikolumnie. Zanieczyszczenia usuwano podczas dwóch etapów płukania, a następnie eluowano DNA ze złoża buforem niskosolnym ogrzanym do temperatury 70 °C. Otrzymywano oczyszczone DNA zawieszone w 50 µl buforu do elucji, które było gotowe do dalszych analiz.

DNA z osadów dennych było izolowane tym samym zestawem, co z próbek wody jeziornej (GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit, EURx). W próbówce z kulkami szklanymi umieszczano 250 mg osadu i postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Na koniec DNA zawieszano w 50 µl buforu eluującego.

DNA z hodowli szczepów cyjanobakterii było izolowane za pomocą zestawu do izolacji DNA z bakterii i drożdży (GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit, EURx), zgodnie z instrukcją producenta. Z hodowli płynnych pobierano 1-3 ml, wirowano przez 3 minuty z prędkością 11000 rpm (12851 x g), następnie usuwano supernatant, a komórki zawieszano w buforze lizującym. Dodawano RNAzę A i proteinazę K. Po inkubacji DNA z roztworu było wiązane do złoża w minikolumnie. Zanieczyszczenia usuwano podczas dwóch etapów płukania, a następnie eluowano DNA ze złoża buforem niskosolnym, ogrzanym do temperatury 80 °C. Otrzymywano preparat oczyszczonego DNA, zawieszonego w 50 µl buforu.

Czystość i stężenie wyizolowanego DNA sprawdzano za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym, lub metodą fluorymetryczną.

4.3.2. Amplifikacja DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Amplifikację DNA przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Eppgradient S Thermocycler (Eppendorf), przy użyciu Taq PCR Core Kit (Qiagen), który zawiera: polimeraza Taq (5U/ μ l), dNTP (4x10 mM), $MgCl_2$ (25 mM), bufor (10x stężony) z $MgCl_2$ (15 mM), odczynnik Q poprawiający jakość amplifikacji (5x stężony).

Składniki mieszaniny reakcyjnej (25 μ l):

- starter F - 1 μ l (0,4 μ M)
- starter R - 1 μ l (0,4 μ M)
- dNTPs - 2,5 μ l (0,2 mM każdego z dNTP)
- $MgCl_2$ - 2,5 μ l (końcowe stężenie $MgCl_2$ w reakcji 4 mM)
- bufor 10x z $MgCl_2$ - 2,5 μ l (końcowe stężenie w reakcji 1x)
- odczynnik Q 5x - 5 μ l (końcowe stężenie w reakcji 1x)
- matryca DNA - 1 μ l (zwykle około 20 ng DNA)
- polimeraza Taq - 0,1 μ l (0,5U)
- H_2O - 11,4 μ l

Charakterystyka starterów używanych niniejszej pracy znajduje się w Tabeli 4.

Tabela 4. Startery używane do PCR.

Locus	Starter Forward 5'-3'	Starter Reverse 5'-3'	Target	Zastosowanie w pracy	Opis	Literatura
ITS	CSIF *(GC)GYCACGCC GAAGTCRTTAC	373R CTAACCACTGA GCTAAT	Cyjanobakterie	DGGE, sekwencjonowanie	Różnorodność populacji i skład taksonomiczny cyjanobakterii w jeziorach.	Janse i wsp. 2003
mcyA	GCmcyA-Cd1F *(GC)AAAATTA AGCCGTATCAAA	mcyA-Cd1R AAAAGTGTTTTA TTAGCGGCTCAT	Cyjanobakterie	DGGE, sekwencjonowanie	Skład taksonomiczny cyjanobakterii potencjalnie toksycznych w jeziorach.	Hisbergues i wsp. 2003 Ye i wsp. 2009 Bukowska i wsp. 2014
mcyA	mcyA-Cd1F AAAATTAAGC CGTATCAAA	mcyA-Cd1R AAAAGTGTTTTA TTAGCGGCTCAT	Cyjanobakterie	PCR, sekwencjonowanie	Sprawdzanie obecności genów toksycznych w szczepach pikocyjanobakterii.	Hisbergues i wsp. 2003
mcyD	mcyDF GATCCGATTGAAT TAGAAAG	mcyDR GTATTCCCAAG ATTGCC	Cyjanobakterie	PCR, sekwencjonowanie	Sprawdzanie obecności genów toksycznych w szczepach pikocyjanobakterii.	Rantala i wsp. 2004
mcyE	mcyE-F2 GAAATTTGTGTAG AAGGTGC	mcyE-R4 AATTCTAAAGCC CAAAGACG	Cyjanobakterie	PCR, sekwencjonowanie	Sprawdzanie obecności genów toksycznych w szczepach pikocyjanobakterii.	Rantala i wsp. 2004
mlrA	MF GACCCGATGTTCA AGATACT	MR CTCCTCCACAA ATCAGGAC	Bakterie posiadające klaster <i>mlr</i>	PCR, sekwencjonowanie	Obecność bakterii zdolnych do degradacji mikrocytyn w wodzie i osadach dennych jezior.	Saito i wsp. 2003 Chen i wsp. 2010b
mlrB	mlrBfl CGTGCGGACTACT GTTGG	mlrBr1 CGACGATGAGA TACTGTCC	Bakterie posiadające klaster <i>mlr</i>	PCR, sekwencjonowanie	Obecność bakterii zdolnych do degradacji mikrocytyn w wodzie i osadach dennych jezior.	Ho i wsp. 2007b
mlrC	mlrCfl TCCCCGAAACCGA TTCTCCA	mlrCr1 CCGGCTCACTGA TCCAAGGCT	Bakterie posiadające klaster <i>mlr</i>	PCR, sekwencjonowanie	Obecność bakterii zdolnych do degradacji mikrocytyn w wodzie i osadach dennych jezior.	Ho i wsp. 2007b
mlrD	mlrDfl GCTGGCTGCGACG GAAATG	mlrDr1 ACAGTGTGCCG AGCTGCTCA	Bakterie posiadające klaster <i>mlr</i>	PCR, sekwencjonowanie	Obecność bakterii zdolnych do degradacji mikrocytyn w wodzie i osadach dennych jezior.	Ho i wsp. 2007b

* (GC) oznacza 5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCGCCCC3'

Programy reakcji dla poszczególnych par starterów:

CSIF i 373R**

94°C	5 min	
94°C	1 min	20x
61°C - 51°C (zmniejszana o 0,5°C w każdym cyklu)	1 min	
72°C	1 min	
94°C	30 s	10x
51°C	40 s	
72°C	40 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

GCmcyA-Cd1F i mcyA-Cd1R**

94°C	5 min	
94°C	1 min	20x
59°C - 47°C (zmniejszana o 0,6°C w każdym cyklu)	1 min	
72°C	1 min	
94°C	30 s	10x
47°C	40 s	
72°C	40 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

** W programach PCR używanych do DGGE zastosowano stopniowe obniżanie temperatury przyłączania starterów, w celu zredukowania niespecyficznego przyłączania się starterów do matrycy.

mcyA-Cd1F i mcyA-Cd1R

94°C	5 min		
94°C	30 s	33x	
56°C	30 s		
72°C	30 s		
72°C	10 min		
4°C	∞		

mcyDF i mcyDR oraz mcyE-F2 i mcyE-R4

94°C	5 min		
94°C	30 s	30x	
49,5°C	30 s		
72°C	1 min		
72°C	10 min		
4°C	∞		

MF i MR

94°C	5 min		
94°C	20 s	35x	
50°C	10 s		
72°C	30 s		
72°C	10 min		
4°C	∞		

mlrBfl i mlrBr1

94°C	5 min	
94°C	20 s	35x
54°C	10 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

mlrCfl i mlrCr1 oraz mlrDfl i mlrDr1

94°C	5 min	
94°C	20 s	35x
60°C	10 s	
72°C	30 s	
72°C	10 min	
4°C	∞	

4.3.3. Sprawdzanie ilości i jakości DNA**4.3.3.1. Elektroforeza w żelu agarozowym**

Elektroforezę agarozową przeprowadzano w celu uwidocznienia na żelu DNA po izolacji z próbek środowiskowych, a także produktów reakcji PCR. W zależności od wielkości cząsteczek rozdzielanego DNA przygotowywano żele o różnym stężeniu agarozy - w przypadku DNA genomowego 1%, dla produktów PCR 1,5-2,5%.

Do sporządzenia żeli używano agarozę (A9539, Sigma) oraz samodzielnie przygotowany bufor TAE (stężenie robocze 1x: 40 mM Tris (T1503, Sigma), 20 mM kwas octowy (A6283, Sigma), 1 mM EDTA (ED, Sigma)). Roztwór agarozy i buforu TAE podgrzewano w kuchence mikrofalowej, aż do całkowitego rozpuszczenia się agarozy. Po przestudzeniu roztwór wlewano do przygotowanego aparatu do elektroforezy, wkładano grzebień formujący

kieszonki i czekano około 30 minut na zastygnięcie. Następnie na żel nakładano 2-10 μ l próbki DNA, w zależności od przewidywanego stężenia. Przed nałożeniem próbkę mieszano z buforem obciążającym (6x Orange Loading Dye, R0631, Thermo Fisher). Do jednej z kieszonek nakładano również marker wielkości. Elektroforezę prowadzono w aparacie wypełnionym buforem TAE przez 40-60 minut, przy stałym napięciu, wynoszącym 60-95 V, w zależności od użytego aparatu i długości żelu.

Żele barwiono przez 15 minut w 1% roztworze bromku etydyny (46067, Fluka) i wody dejonizowanej, lub przed elektroforezą dodawano do każdej próbki DNA 1 μ l SYBR Green I (S9430, Sigma, 10000x, stężenie robocze 100x).

Żele oglądano na transiluminatorze (Benchtop 2UV, UVP) oraz dokumentowano przy pomocy aparatu Canon EOS 600D.

4.3.3.2. Fluorymetryczny pomiar stężenia DNA

W niektórych próbkach stężenie DNA było również mierzone fluorymetrycznie, za pomocą zestawu Quant-iT dsDNA Assay Kit, Broad Range (Q33130, Life Technologies) i czytnika mikropłytek Synergy H1 (BioTek), według instrukcji producenta. Przygotowywano roztwór roboczy mieszając reagent BR i bufor BR w stosunku 1:200. Po 200 μ l roztworu przenoszono do studzienek na czarnej płytce 96-dołkowej. Do studzienek dodawano po 2 μ l mierzonych próbek, każdą w trzykrotnym powtórzeniu. Mierzono fluorescencję na czytniku mikropłytek przy długości fal ekscytacji/emisji 500/530 nm. Stężenie badanego DNA odczytywano z równania regresji liniowej krzywej standardowej, wykonanej przy pomocy 8 różnych, wzrastających stężeń DNA wzorcowego.

4.3.4. DGGE

Elektroforeza w gradiencie denaturującym pozwala na rozdzielenie znajdujących się w jednej próbce fragmentów DNA o tej samej długości, ale różniących się składem nukleotydów (Rys. 10). Rozdzielanie fragmentów DNA odbywa się w żelu poliakrylamidowym, zawierającym liniowy gradient czynników denaturujących - formamidu i mocznika (100% stężenie czynników denaturujących definiuje się jako 7M mocznik i 40% (v/v) formamid). Metoda wykorzystuje różnice w stabilności par G-C i A-T w dwuniciowym DNA, wynikające z różnej liczby wiązań wodorowych pomiędzy nukleotydami (2 w parach A-T

i 3 w parach G-C). Fragmenty DNA bogatsze w pary G-C są bardziej stabilne, będą rozdzielały się na pojedyncze nici DNA przy wyższych stężeniach czynników denaturujących. Dwuniciowe DNA migruje w żelu poliakrylamidowym, dopóki nie zostanie rozdzielone na pojedyncze nici. Do końca 5' jednego ze starterów używanych do amplifikacji DNA, które później będzie rozdzielane metodą DGGE, dołącza się klamrę GC. Jest to około 40-nukleotydowy odcinek, zawierający wyłącznie GC. Klamra GC nie pozwala na całkowite rozdzielanie się dwuniciowego DNA podczas elektroforezy. Optymalizacja warunków elektroforezy DGGE (stężenie poliakrylamidu, zakres gradientu, długość trwania elektroforezy, napięcie prądu) jest niezbędna przy każdym jej zastosowaniu.

Wynikiem DGGE jest otrzymanie dla każdej badanej próbki wzoru prążkowego, w którym jeden prążek zawiera zamplifikowane fragmenty DNA, nie różniące się sekwencją. Częsteczki z różnych próbek, ale o tej samej sekwencji można znaleźć na tej samej wysokości żelu w różnych ścieżkach. Każdy prążek w ścieżce traktowany jest jako oddzielna operacyjna jednostka taksonomiczna (OTU, ang. operational taxonomic unit).

W niniejszej pracy analizę DGGE przeprowadzano w aparacie BioRad TMDCode Universal Mutation Detection System. Sporządzano żele 1-mm grubości, o 7% stężeniu poliakrylamidu, w których gradient czynników denaturujących wzrastał od 20% do 60%.

Metodę DGGE stosowano do rozdzielania zamplifikowanych mieszanin fragmentów DNA:

- ITS - do badania różnorodności cyjanobakterii,
- *mcyA* - do badania różnorodności cyjanobakterii potencjalnie toksycznych.

4.3.4.1. Przygotowanie odczynników do sporządzenia żeli poliakrylamidowych

Sporządzano roztwory 7% akrylamidu, jeden z dodatkiem środków denaturujących, a drugi bez dodatków. Roztwory przechowywano przez okres do 2 miesięcy w temperaturze 4 °C, w ciemności.

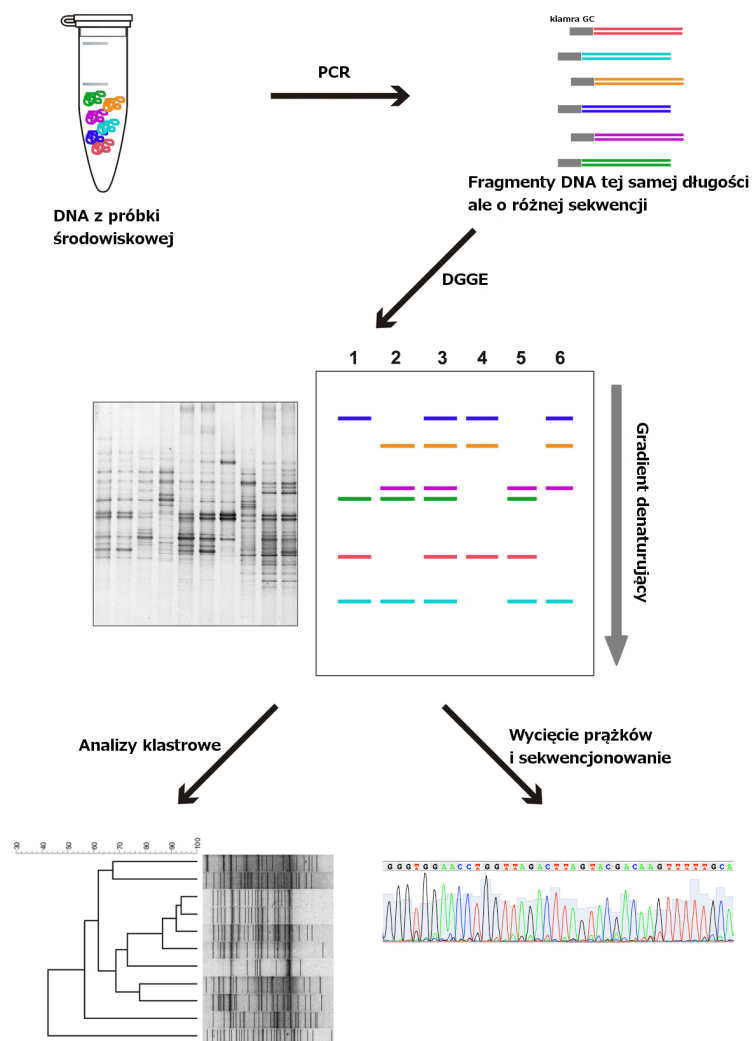
- 7% akrylamid (100 ml)

17,5 ml 40% akrylamidu/bis-akrylamidu 37,5:1 (A7168, Sigma-Aldrich),
2 ml 50x stężonego buforu TAE, dopełniano wodą dejonizowaną do 100 ml.

- 7% akrylamid ze 100% stężeniem czynników denaturujących (100ml)

17,5 ml 40% akrylamidu/bis-akrylamidu 37,5:1, 2 ml 50x stężonego buforu TAE,
40 ml 99,5% formamidu (47671, Sigma-Aldrich), 41,25 g mocznika (51456, Fluka),

dopełniano wodą dejonizowaną do 100 ml. Mieszaninę delikatnie podgrzewano, do całkowitego rozpuszczenia się mocznika.



Rysunek 10. Schemat elektroforezy w gradiencie denaturującym (DGGE) i sposoby analizy jej wyników (zmienione za Jasser i wsp. 2017).

4.3.4.2. Przygotowanie żeli z gradientem denaturującym

Do sporządzenia jednego żelu przygotowywano 2 roztwory zgodnie z Tabelą 5. APS i TEMED, które pozwalają na polimeryzację akrylamidu, dodawano do roztworów bezpośrednio przed waniem ich do urządzenia formującego gradient.

Szybki i przekładki dokładnie myto i przecierano 70% etanolem. Zestawy do wylewania żeli składano zgodnie z instrukcją producenta i ustawiano w statywie. Urządzenie do formowania gradientu ustawiano na mieszadle magnetycznym nad statywem z szybkami. Koniec wężyka urządzenia, zakończony igłą, umieszczano między szybkami. Mieszadło umieszczano w prawej komorze urządzenia (znajdującej się bliżej wężyka). Roztwory 1 i 2 (Tab. 5) wlewano do odpowiednich komór urządzenia do formowania gradientu (roztwór o niższym stężeniu czynników denaturujących do lewej, o wyższym stężeniu do prawej komory). Roztwory z obu komór stopniowo mieszały się tworząc odpowiedni gradient i wypełniały przestrzeń między szybkami. Po całkowitym wypełnieniu, między szybkami umieszczano grzebień tworzący kieszonki. Urządzenie do tworzenia gradientu, wężyk i igłę przepłukiwano niezwłocznie wodą dejonizowaną, aby uniemożliwić polimeryzację resztek akrylamidu. Całą procedurę powtarzano w celu wylania drugiego żelu. Czekano przynajmniej 2 godziny na całkowitą polimeryzację żeli.

Tabela 5. Skład roztworów potrzebnych do sporządzenia żelu z gradientem denaturującym

roztwór 1 (20% czynników denaturujących)	roztwór 2 (60% czynników denaturujących)
3,2 ml 7% akrylamidu ze 100% stężeniem czynników denaturujących	9,6 ml 7% akrylamidu ze 100% stężeniem czynników denaturujących
12,8 ml 7% akrylamidu	6,4 ml 7% akrylamidu
12 µl 99% TEMED (T9281, Sigma-Aldrich)	12 µl 99% TEMED (T9281, Sigma-Aldrich)
120 µl 10% APS (A3678, Sigma-Aldrich)	120 µl 10% APS (A3678, Sigma-Aldrich)

4.3.4.3. Elektroforeza

Przed rozpoczęciem elektroforezy przygotowywano 7 litrów buforu TAE i podgrzewano go w aparacie do elektroforezy do 60 °C. Szybki ze spolimeryzowanymi żelami umieszczano w aparacie, wyjmowano grzebienie i przepłukiwano kieszonki buforem TAE. Przygotowywano próby do nałożenia na żel – 20 µl produktu PCR mieszano z 10 µl buforu obciążającego. Próbkę nakładano do kieszonek używając 200 µl końcówek kapilarnych. Na każdym żelu, przynajmniej 2 kieszonki przeznaczano na próbki standardowego DNA (mieszanina fragmentów DNA tworząca na żelu znany, powtarzalny wzór; standardowe DNA przygotowano samodzielnie). Nie używano skrajnych kieszonek na żelu, do nich dodawano tylko po 30 µl buforu obciążającego. Elektroforezę prowadzono w stałej temperaturze 60 °C, pierwsze 5 min przy napięciu 200 V, a następnie przez 16 h przy napięciu 50V.

4.3.4.4. Barwienie żeli

Po zakończeniu elektroforezy szybki z żelami wyjmowano z aparatu, delikatnie oddzielano żele od szybki i umieszczano je w płaskim naczyniu w roztworze 14 µl SYBR Green I 10000x (S9430, Sigma-Aldrich) i 200 ml wody dejonizowanej. Żele barwiono przez 15 minut w ciemności a następnie oglądano w świetle UV i fotografowano. Zdjęcia wzorów prążkowych, po obróbce cyfrowej, mogły być użyte do dalszych analiz.

4.3.4.5. Wycinanie prążków z żelu, reamplifikacja i przygotowanie do sekwencjonowania

W celu analizy sekwencji DNA wybrane prążki wycinano z żelu sterylnym skalpelem. Wycięty prążek umieszczano w sterylnej probówce typu Eppendorf i dodawano 40 µl sterylnej wody dejonizowanej. Inkubowano przez 24 h w 4 °C. Eluentu używano jako matrycy do ponownej amplifikacji metodą PCR, z tym samym zestawem starterów, który użyto poprzednio. Reakcję PCR przeprowadzano w objętości 35 µl, a produkty reakcji wizualizowano na żelu agarozowym. Jeśli reamplifikacja wyeluowanego DNA się powiodła, sprawdzano homogenność produktu PCR przeprowadzając ponowne DGGE, nakładając na żel poliakrylamidowy 15 µl zreamplifikowanej próbki. Jeśli na żelu był widoczny tylko jeden prążek, w tej samej pozycji, co na pierwszym DGGE, resztę produktu reamplifikacji można było użyć jako matrycę do sekwencjonowania.

4.3.5. Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA przeprowadzano metodą Sanger, używając BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Metodę tę stosowano, aby poznać sekwencje:

- DNA z prążków wycinanych i reamplifikowanych po DGGE-ITS i DGGE-*mcyA*,
- produktów PCR *mcyA*, D, E szczepów pikocyjanobakterii,
- produktów PCR *mlrA*, B, C, D charakterystycznych dla bakterii rozkładających toksyny, z wody i osadów dennych jezior.

4.3.5.1. Przygotowanie DNA do sekwencjonowania

Produkt reakcji PCR oczyszczano za pomocą zestawu GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kit (EURx), zgodnie z instrukcją producenta. Po oczyszczeniu sprawdzano obecność DNA w roztworze za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, lub dodatkowo mierzono stężenie DNA metodą fluorescencyjną. W zależności od stężenia do reakcji sekwencjonowania używano inną objętość roztworu DNA.

4.3.5.2. Reakcja sekwencjonowania

Sekwencjonowanie przeprowadzano za pomocą tych samych starterów, które wcześniej były używane do amplifikacji danego fragmentu DNA. W przypadku DNA z reamplifikowanych prążków wyciętych z żelu DGGE używano starterów bez klamry (GC). Reakcja sekwencjonowania prowadzona była w termocyklerze Mastercycler Eppgradient S Thermocycler (Eppendorf). Dla każdej próbki DNA przeprowadzano dwie reakcje, oddzielnie ze starterem F (forward) i R (reverse).

Składniki jednej reakcji sekwencjonowania (10 μ l):

- starter - 1 μ l (0,16 μ M)
- matryca DNA - 1-4 μ l (100-200 ng)
- terminator - 5 μ l (ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq, bufor)
- sterylne woda dejonizowana - dopełniano do 10 μ l

Program reakcji sekwencjonowania:

96 °C	15 s	30 x
50 °C	10 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

4.3.5.3. Oczyszczanie produktów sekwencjonowania

Przygotowywano zawiesinę 50 mg Sephadex G-50 Fine (Amersham Biosciences) i 800 µl sterylnej wody dejonizowanej (na jedną próbkę) i zostawiano 30 minut do napęcznienia. Takim złożem napełniano sterylne mikrokolumnienki wielorazowego użytku i wirowano 3 min z prędkością 3000 rpm. Następnie kolumnienki umieszczano na nowych sterylnych probówkach typu Eppendorf 1,5 ml, na złożu nakładano cały oczyszczony produkt sekwencjonowania i ponownie wirowano 3 min z prędkością 3000 rpm.

4.3.5.4. Odczyt sekwencji

Oczyszczone produkty reakcji sekwencjonowania wysyłano do odczytu w wyspecjalizowanym laboratorium (Genomed, Warszawa).

4.3.6. qPCR

Real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), nazywany również qPCR (ilościowy PCR) umożliwia oznaczenie ilości badanego fragmentu DNA w próbce. Jedną z odmian qPCR, używaną w niniejszych badaniach jest TNA (ang. TaqMan Probe Assay), czyli ilościowy PCR z wykorzystaniem fluorescencyjnych sond, specyficznych do wybranego fragmentu DNA. Sonda, czyli krótki fragment DNA komplementarny do matrycy, ma dołączony fluorescencyjny znacznik na końcu 5' i quencher (wgaszacz fluorescencji) na końcu 3'. Podczas PCR, gdy sonda jest przyłączona do matrycy, polimeraza DNA dobudowując komplementarną nić napotyka przyłączoną sondę i odcina od jej końca 5' fluorescencyjny znacznik. Gdy znacznik znajdzie się w oddaleniu od quenchera, emituje sygnał fluorescencyjny, który jest odczytywany przez detektor w urządzeniu do qPCR. Przyrost

fluorescencji w każdym cyklu PCR jest proporcjonalny do przyrostu liczby kopii produktu PCR.

Aby oszacować początkową ilość badanego fragmentu DNA w próbce, wyznaczany jest Cq (quantification cycle), czyli moment, w którym zaczyna się logarytmiczny przyrost ilości produktu PCR. Im wcześniej następuje ta faza (niższe Cq), tym więcej kopii badanego fragmentu DNA było w wyjściowej próbce. Krzywą standardową wyznacza się sporządzając serię rozcieńczeń roztworu, zawierającego znaną liczbę kopii badanego DNA i wyznaczając Cq dla każdego z tych rozcieńczeń.

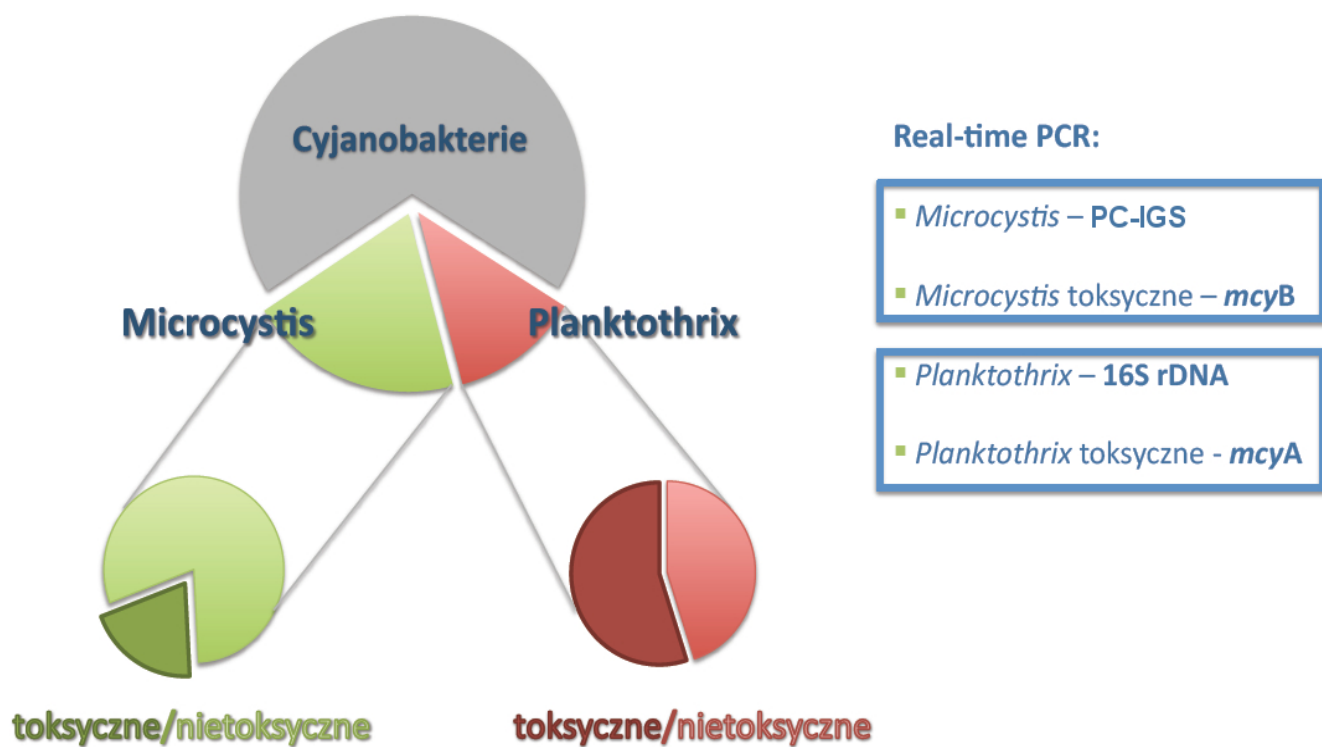
W celu standaryzacji procedur oraz terminologii, w niniejszej pracy zastosowane zostały wytyczne dotyczące minimum informacji dla publikacji eksperymentów z zastosowaniem qPCR (minimum information for publication of quantitative PCR experiments - MIQE guidelines - Bustin i wsp. 2009).

4.3.6.1. Schemat eksperymentu

Celem badań było oszacowanie całkowitej liczebności w próbkach wody cyjanobakterii z dwóch rodzajów *Microcystis* i *Planktothrix*, oraz oszacowanie liczebności cyjanobakterii potencjalnie toksycznych (posiadających geny odpowiedzialne za wytwarzanie mikrocyzyn) z tych samych dwóch rodzajów (Rys. 11). Aby wyznaczyć ogólną liczebność *Microcystis* spp. używano fragmentu operonu fikocyjaniny PC-IGS, a ogólną liczebność *Planktothrix* spp. - fragmentu rybosomalnego 16S rDNA. W celu poznania liczebności potencjalnie toksycznych sinic używano fragmentów genów klastra *mcy* - dla *Microcystis* spp. *mcyB*, a dla *Planktothrix* spp. *mcyA*. Opis używanych starterów i sond znajduje się w Tabelach 6 i 7.

Badania prowadzono w formie dwóch multipleksowych PCR - w jednej reakcji znajdowały się startery i sondy kwantyfikujące ogólną liczbę komórek oraz liczbę komórek potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp., oraz analogicznie w drugiej reakcji ogólną liczbę oraz potencjalnie toksyczne *Planktothrix* spp. Takie rozwiązanie umożliwia zliczanie kopii badanego DNA dokładnie w tych samych komórkach (Rys. 11).

Program reakcji PCR został dobrany tak, aby był taki sam dla obu multipleksowych PCR. Umożliwiało to analizę wszystkich badanych genów razem na jednej płytce.



Rysunek 11. Schemat badań z wykorzystaniem real-time PCR. Ramkami zaznaczono analizy, które wykonywano w formie reakcji multipleks PCR.

Tabela 6. Startery i sondy używane do qPCR

Locus	Starter Forward 5'-3'	Starter Reverse 5'-3'	Sonda 5'-3'	Wielkość produktu PCR (pz)	Target	Opis	Literatura
16S rDNA	F16S ATCCAAGT CTGCTGTGA AAGA	R16S CTCTGCCCC TACTACACT CTAG	P16S Fam- AAAGGCAGTG GAAACTGGAA G-BHQ1	82	<i>Planktothrix</i> spp.	Całkowita liczebność <i>Planktothrix</i> spp.	Ostermaier i Kurmayer 2009, Savichtcheva i wsp. 2011
PC-IGS	188F CGTACTTCG ACCGCGCC	254R TCCTACGGT TTAATTGA GACTAGCC	PCMC LCRed610- CCGCTGCTGTC GCCTAGTCCCT G-BHQ2	66	<i>Microcystis</i> spp.	Całkowita liczebność <i>Microcystis</i> spp.	Kurmayer i Kutzenberger 2003
mcyA	MAPF CTAATGGC CGATTGGA AGAA	MAPR CAGACTAT CCCGTTCCG TTG	MAPTaq LC480Cyan500- CTCTGCGGTTA CAGCTAACGG GTGG-BHQ1	140	<i>Planktothrix</i> spp.	Liczebność <i>Planktothrix</i> spp. potencjalnie toksycznego	Briand i wsp. 2008, Savichtcheva i wsp. 2011
mcyB	30F CCTACCGA GCGCTTGG G	108R GAAAAATCC CCTAAAGA TTCCTGAGT	MCYBMC Fam- CACCAAAGAA ACACCCGAAT CTGAGAGG- BHQ1	78	<i>Microcystis</i> spp.	Liczebność <i>Microcystis</i> spp. potencjalnie toksycznego	Kurmayer i Kutzenberger 2003

Tabela 7. Znaczniki fluorescencyjne w używanych sondach

Nazwa sondy	Znacznik fluorescencyjny	Filtr ekscytacji/emisji (nm)	Quencher	Zakres działania quenchera (nm)
MAPTaq	LightCycler Cyan500	440/480	BHQ-1	480-580
P16S	Fluorescein FAM	498/580	BHQ-1	480-580
MCYBMC	Fluorescein FAM	498/580	BHQ-1	480-580
PCMC	LightCycler Red610	533/610	BHQ-2	550-650

4.3.6.2. Procedura qPCR

Do reakcji qPCR używano urządzenia LightCycler 480 (Roche) oraz zestawu odczynników LightCycler480 Probes Master (04887301001, Roche). Wszystkie reakcje przeprowadzano w trzech powtórzeniach, na białych płytkach 384-dołkowych (FrameStar 4ti-0381, 4titude), w objętości 10 μ l.

Składniki mieszanin reakcyjnych (10 μ l):

Analiza *Microcystis* spp. i potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp.

- Master Mix - 5 μ l
- Starter 88F - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Starter 254R - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Sonda PCMC - 0,1 μ l (0,1 μ M)
- Starter 30F - 0,9 μ l (0,9 μ M)
- Starter 108R - 0,9 μ l (0,9 μ M)
- Sonda MCYBMC - 0,25 μ l (0,25 μ M)
- H₂O - 0,25 μ l

Analiza *Planktothrix* spp. i potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp.

- Master Mix - 5 μ l
- Starter F16S - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Starter R16S - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Sonda P16S - 0,2 μ l (0,2 μ M)
- Starter MAPF - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Starter MAPR - 0,3 μ l (0,3 μ M)
- Sonda MAPTaq - 0,2 μ l (0,2 μ M)
- H₂O - 1,4 μ l

Program qPCR:

95°C	10 min	
95°C	10 s	60x
60°C	30 s	
72°C	1 s *	
40°C	10 s	

* odczyt fluorescencji

4.3.6.3. Wyznaczanie krzywych standardowych

Krzywe standardowe były wyznaczone za pomocą hodowlanych szczepów *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii*, które posiadają w swoich genomach klaster *mcy*, odpowiedzialny za wytwarzanie mikrocystyn. Szczep *Planktothrix agardhii* 6.89 pochodził z SAG (The Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany), a szczep *Microcystis aeruginosa* CCNP 1103 z kolekcji Uniwersytetu Gdańskiego. Szczepy były hodowane na pożywce BG11 w warunkach nie akseńicznych.

Zastosowano podejście, w którym krzywe standardowe tworzone są poprzez odniesienie wartości C_q do wartości odpowiadającej liczbie komórek w reakcji qPCR, zamiast do liczby kopii badanego genu (Kurmayer i Kutzenbrger 2003, Zhang i wsp. 2014).

Izolacja DNA ze szczepów musiała być przeprowadzana ze ściśle określonej liczby komórek. Bezpośrednio przed pobraniem próbki do izolacji DNA liczebność komórek w każdym ze szczepów była liczona przy pomocy mikroskopu epifluorescencyjnego Nikon Eclipse z filtrem CY3, w zielonym świetle, przy powiększeniu 1000x. Izolacja DNA z 2 ml hodowli była przeprowadzana zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.3.1.

Do wyznaczenia krzywych standardowych dla wszystkich czterech analiz używano tej samej mieszaniny DNA, zawierającej wyizolowane DNA ze szczepów *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* w stężeniach 141000 kom/ μ l i 112000 kom/ μ l (jako jednostkę stosowano odpowiednik liczby komórek z których wyizolowane było DNA w 1 μ l mieszaniny). Z tak przygotowanej mieszaniny sporządzono serię sześciu pięciokrotnych rozcieńczeń. Krzywe standardowe zostały wyznaczone w programie do analizy qPCR (LightCycler 480 Software, Roche). W analizowanych próbkach środowiskowych obliczone za pomocą krzywych standardowych wartości liczby komórek na reakcję były przeliczane na końcowy wynik liczby komórek na 1 litr wody jeziornej.

4.3.6.4. Specyficzność sond i starterów oraz wydajność reakcji qPCR

Specyficzność używanych starterów i sond została potwierdzona we wcześniejszych publikacjach (Kurmayer i Kutzenbrger 2003, Savichtcheva i wsp. 2011). W niniejszej pracy przeprowadzono również kilka testów specyficzności. Aby wykluczyć niespecyficzną amplifikację przeprowadzono reakcje qPCR, w których używano starterów i sond dla *Microcystis* spp., a jako matrycę DNA wyizolowane ze szczepu *Planktothrix agardhii*;

i analogicznie odwrotny test - startery i sondy specyficzne dla *Planktothrix* spp. i DNA ze szczepu *Microcystis aeruginosa*.

Kolejnym testem było zmieszanie wyizolowanego DNA z obydwu szczepów i sprawdzenie, czy wyniki reakcji qPCR będą takie same, jak wtedy, gdy w próbce znajduje się DNA tylko jednego szczepu.

Ponadto mieszano DNA wyizolowane ze szczepów *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* w znanych proporcjach z DNA wyizolowanym z wody jeziornej, w której analizy mikroskopowe nie wykazały obecności tych dwóch rodzajów cyjanobakterii, ale wykazały obecność innych cyjanobakterii. Ten test miał na celu sprawdzenie czy obecność DNA innych rodzajów sinic wpływa na amplifikację DNA *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp., czy może powodować powstawanie niespecyficznych produktów, oraz czy w wodzie jeziornej znajdują się ewentualne inhibitory wpływające na jakość reakcji qPCR.

4.4. Badanie stężenia mikrocystyn w wodzie

Do oznaczania stężenia mikrocystyn w przefiltrowanych próbkach wody jeziornej używano testu ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbant assay) EnviroGard Microcystins 7 Plate Kit (Modernwater, USA), który pozwala na pomiar stężenia w zakresie 0,1-1,6 µg/l. Każdą próbkę analizowano w dwóch powtórzeniach.

Analiza ta polega na użyciu poliklonalnych przeciwciał, immobilizowanych na ściankach testowych studzienek, z którymi mogą wiązać się albo mikrocystyny, albo mikrocystynowy enzym koniugujący, który następnie łączy się ze znakowanym substratem, co w rezultacie nadaje próbce niebieską barwę. Mikrocystyny w próbce wody konkurują z enzymem o limitowaną liczbę miejsc do wiązania. W próbkach o niskim stężeniu mikrocystyn większość przeciwciał zostanie związana z enzymem koniugującym, nadając próbce intensywniejszy kolor. Intensywność koloru jest więc odwrotnie proporcjonalna do stężenia mikrocystyn.

Wyniki analizy odczytywano spektrofotometrycznie w czytniku mikropłytek Stat Fax 303 Plus (Awareness Technology, USA), przy długościach fal 450 i 650 nm.

4.5. Inne analizy fizyko-chemiczne i biologiczne

4.5.1. Analiza parametrów fizyko-chemicznych wody *in situ*

Temperatura, stężenie tlenu, przewodnictwo, mętność i pH wody w profilu pionowym jeziora były mierzone *in situ* w czasie pobierania próbek do badań, za pomocą wieloparametrycznej sondy YSI 6000 (YSI Inc., USA). Jednocześnie mierzono również widzialność krążka Secchi'ego.

4.5.2. Mikroskopowe oznaczanie składu taksonomicznego i biomasy fitoplanktonu, w tym cyjanobakterii

Analizy mikroskopowe fitoplanktonu i cyjanobakterii zostały przeprowadzone przez dr hab. Iwonę Jasser oraz mgr Aleksandrę Bielczyńską z Zakładu Ekologii Mikroorganizmów i Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Biologii UW.

Analizy wykonywano metodą Utermöhl (1958), przy pomocy mikroskopu odwróconego Nikon Eclipse TS 100, używając powiększeń 100x, 200x i 400x. Fitoplankton z utrwalonej próbki wody sedimentowano w kolumnach o objętości 25 ml lub 50 ml. Z każdej próbki analizowano przynajmniej dwie podpróbki, lub, jeśli wyniki z dwóch podpróbek różniły się znacząco, analizowano także trzecią podpróbę. Aby oznaczyć skład taksonomiczny i biomasę cyjanobakterii najpierw przeglądano cały preparat, w celu identyfikacji rzadziej występujących taksonów. Taksony występujące częściej były liczone i mierzone na 20 losowo wybranych polach, pod powiększeniem 200x lub 400x. Liczba komórek u nitkowatych taksonów cyjanobakterii była szacowana na podstawie sumarycznej długości nici i średniej długości komórek dla danego taksonu. Skład taksonomiczny cyjanobakterii identyfikowano przy użyciu kluczy do oznaczania fitoplanktonu (Starmach 1966, Hindák 1978, Starmach 1989) i cyjanobakterii (Pliński i Komárek 2007, Komárek i Anagnostidis 2008a, Komárek i Anagnostidis 2008b), albumu ze zdjęciami cyjanobakterii (Hindák 2008) i serii artykułów w czasopiśmie Fottea (dawniej Czech Phycology) (Komárek 2001, Komárek 2002, Komárek i Komárkova 2004, Komárek i Komárkova 2006, Komárek i Zapomělová 2007, Komárek i Zapomělová 2008).

Do analiz biomasy pikocyjanobakterii używano mikroskopu epifluorescencyjnego Nikon Eclipse 400, wyposażonego w filtr CY3. Materiał z 10 ml utrwalonej próbki był osadzany na

czarnym filtrze poliwęglanowym o średnicy porów 0,2 μm . Preparaty oglądano pod powiększeniem 1000x.

4.5.3. Ogólna liczba bakterii

Analizy mikroskopowe liczebności bakterii w próbkach wody jeziornej zostały wykonane przez mgr Katarzynę Jakubiec z Zakładu Ekologii Mikroorganizmów i Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Biologii UW. Bakterie barwiono łączącym się z DNA fluorochromowym barwnikiem DAPI i osadzano na czarnych filtrach membranowych (Porter i Feig 1980). Używano mikroskopu epifluorescencyjnego Nikon Eclipse 400 i powiększenia 1000x. Liczebność bakterii w preparatach określano za pomocą komputerowej analizy obrazu mikroskopowego (KAOM) - NIS Elements (Nikon).

4.5.4. Stężenie chlorofilu_a

Stężenie chlorofilu_a w próbkach wody jeziornej mierzono fluorymetrycznie, za pomocą metody EPA 445.0 (Arar i Collins 1997), używając fluorymetru TD-700 (Turner Biosystems, USA). Świeżą próbkę wody o objętości 10 lub 20 ml przesączano przez filtr szklany GF/F, o średnicy porów 0,6 μm . Filtr z osadzonym sestonem umieszczano w 10 ml 90% acetonu i homogenizowano. Chlorofil_a ekstrahowano przez 20 h w temperaturze 4 °C, w ciemności. Następnie ekstrakt odwirowywano przez 12 min z prędkością 5000 rpm, w celu oddzielenia resztek filtra szklanego od klarownego ekstraktu acetonowego. Fluorescencję ekstraktu mierzono przy długościach fal ekscytacji 436 nm i emisji 680 nm. Stężenie chlorofilu_a w ekstrakcie, wyrażone w $\mu\text{g/l}$, odczytywano na fluorymetrze. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Stężenie chlorofilu_a w próbce obliczano przy pomocy wzoru:

$$\text{Chlorofil}_a = R * v_e / v_p$$

gdzie:

R – stężenie chlorofilu_a w ekstrakcie ($\mu\text{g/l}$)

v_e – objętość ekstraktu (ml)

v_p – objętość filtrowanej próbki (ml)

4.5.5. Stężenie azotu i fosforu całkowitego oraz rozpuszczonego węgla organicznego

Analizy stężenia związków biogennych w badanych próbkach zostały wykonane przez mgr Tomasza Kalińskiego z Zakładu Ekologii Mikroorganizmów i Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Biologii UW.

Stężenie azotu całkowitego (TN) mierzono w mineralizowanych próbkach wody, metodą Kjedahla, według Solorzano (1969). Stężenie fosforu całkowitego (TP) oznaczano przy pomocy spektrofotometru Shimadzu UV-VIS 1201, w oparciu o molibdenianową metodę Murphy i Riley (1962), zmodyfikowaną przez Koroleffa (1983). Stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) mierzono przy pomocy analizatora węgla Shimadzu TOC-5050A. Próbkę przed pomiarem filtrowano przez filtr membranowy o średnicy porów 0,2 μm .

4.6. Analizy statystyczne i komputerowe

Obliczenia wartości średnich i odchyłeń standardowych wykonywano w programie Excel 2011 (Microsoft Office). Pozostałe analizy statystyczne wykonywano przy pomocy pakietu Statistica 12.5 (StatSoft).

Nieparametrycznym testem ANOVA Kruskal-Wallis'a sprawdzano, czy występowały różnice w badanych parametrach pomiędzy poszczególnymi grupami jezior lub pomiędzy miesiącami, porami roku czy latami badawczymi.

Test U Mann-Whitney'a, czyli odpowiednik testu t-Studenta dla prób niepowiązanych, stosowano, aby sprawdzić czy pomiędzy dwoma latami, porami roku czy miesiącami badawczymi, lub dwoma grupami jezior występują różnice w badanych parametrach.

Analizę skupień (aglomeracyjną) przeprowadzano w celu klasyfikacji badanych jezior w grupy o najbardziej zbliżonych parametrach biologicznych i fizyko-chemicznych, a także aby wyznaczyć grupy próbek o najbardziej zbliżonej strukturze taksonomicznej cyjanobakterii, na podstawie wyników analizy DGGE. Grupowanie przeprowadzono metodą Warda (1963), która wykorzystuje analizę wariancji do szacowania odległości między skupieniami. Odległości na drzewach hierarchicznych obliczano metodą miejską (Manhattan), w której stłumiony jest efekt pojedynczych przypadków odstających.

Test korelacji rang Spearman'a wykorzystywano do sprawdzenia czy istnieją zależności między zmiennymi takimi jak liczba taksonów cyjanobakterii, udział w populacji genotypów

toksycznych czy obecność bakterii zdolnych do rozkładania toksyn a wartościami parametrów środowiskowych, stężeniem toksyn lub czasem pobierania próbki.

Otrzymane podczas badań sekwencje DNA wizualizowano w programie 4peaks (Nucleobytes). Sekwencje były porównywane z bazą sekwencji (GenBank) za pomocą algorytmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Przyrównania sekwencji wykonywano w programie Mega 6 (Tamura i wsp. 2013), za pomocą algorytmu ClustalW. Analizy filogenetyczne wykonywano w programie Mega 6. Drzewa filogenetyczne tworzone metodą maksymalnego pokrewieństwa (ang. maximum likelihood), przy zastosowaniu modelu GTR (Tavaré 1986).

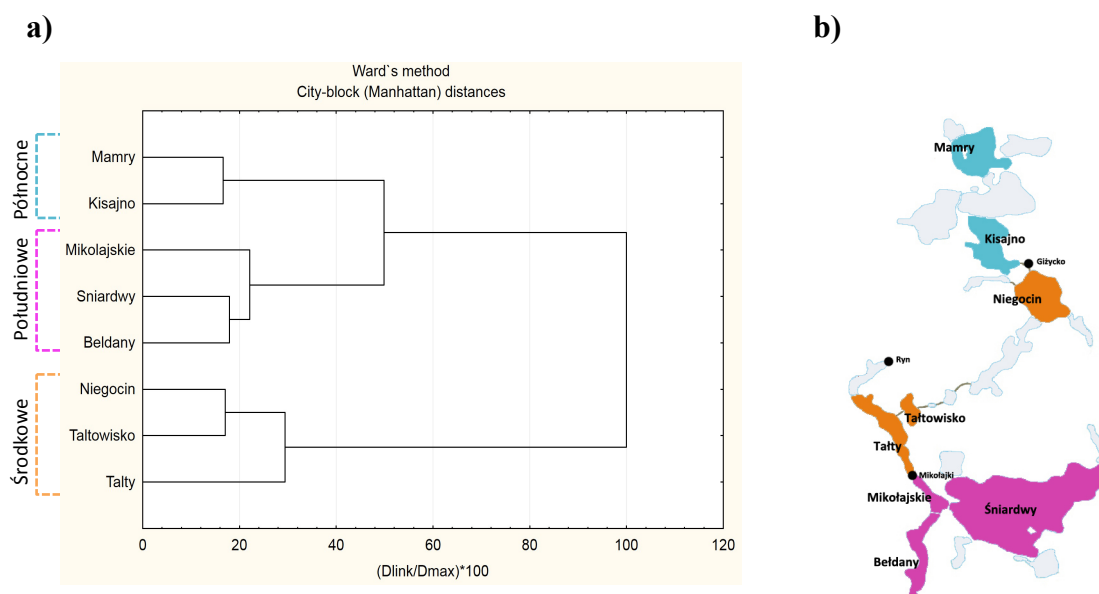
5. Wyniki

5.1. Analiza czynników różnicujących badane jeziora oraz mogących wpływać na obecność i różnorodność cyjanobakterii - tło środowiskowe

Aby zobrazować różnorodność badanych jezior przeprowadzono analizę aglomeracyjną i stworzono dendrogram, pokazujący w jaki sposób grupują się jeziora, przy uwzględnieniu różnych czynników biologicznych oraz fizyko-chemicznych (Rys. 12a). Parametry brane pod uwagę w analizie skupień to:

- stężenie chlorofilu_a ($\mu\text{g/L}$),
- biomasa bakterii (mg C/L),
- biomasa fitoplanktonu (mg/L),
- stężenie fosforu całkowitego ($\mu\text{M/L}$),
- stężenie azotu całkowitego ($\mu\text{M/L}$),
- stężenie rozpuszczonego węgla organicznego (mg C/L),
- widzialność krążka Secchi'ego (m),
- stężenie tlenu na głębokości 1 m (mg/L),
- pH,
- przewodnictwo ($\mu\text{Si/cm}^2$).


Do analizy użyto wyników pomiarów z maja, lipca, sierpnia, września 2011 i 2013 roku, oraz z maja, lipca i sierpnia 2012 roku. Tabele z danymi znajdują się w Załączniku 1.



Rysunek 12. a) Drzewo hierarchiczne dla ośmiu badanych jezior spośród Wielkich Jezior Mazurskich, stworzone metodą Warda (Ward 1963), odległości obliczono metodą miejską (Manhattan), b) mapa przedstawiająca grupy jezior w obrębie systemu WJM, wyróżnione za pomocą analizy skupień: Północne, Środkowe, Południowe.

Wyniki analizy aglomeracyjnej pozwoliły na wyróżnienie trzech grup, skupiających jeziora najbardziej podobne pod względem biologicznych i fizyko-chemicznych parametrów jakości wód. Ze względu na ich położenie geograficzne powstałe grupy nazwano: Jeziora Północne (Mamry, Kisajno), Środkowe (Niegocin, Tałtowisko, Tałty) oraz Południowe (Mikołajskie, Śniardwy, Beldany) (Rys. 12b).

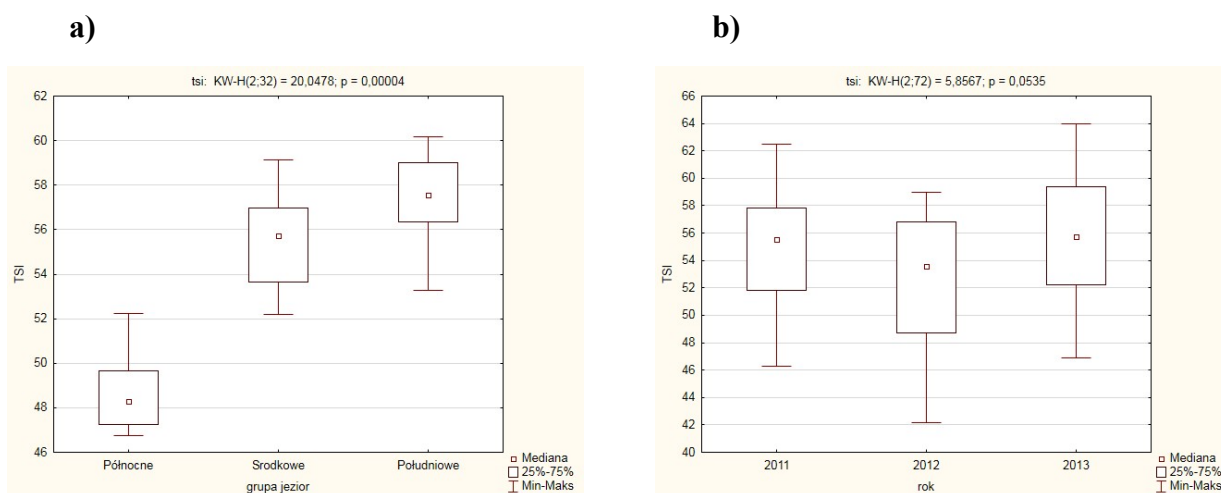
Parametrem, który określał aktualny stan troficzny jezior była wartość TSI (indeks stanu troficznego Carlsona, Carlson 1977). TSI obliczano na podstawie stężenia chlorofilu_a, widzialności krążka Secchi'ego oraz stężenia fosforu całkowitego i wynik uśredniano. Tabela 8 przedstawia wartości TSI w badanych jeziorach w czterech okresach sezonu wegetacyjnego (maj, lipiec, sierpień, wrzesień). Wyniki dla poszczególnych miesięcy zostały uśrednione z pomiarów z trzech lat badawczych (2011, 2012 i 2013).

Tabela 8. Indeks stanu troficznego obliczony na podstawie stężenia chlorofilu_a, widzialności krążka Secchi’ego oraz stężenia fosforu całkowitego. Kolorami oznaczono grupy jezior wyznaczone na podstawie analizy skupień: ■ Północne, ■ Środkowe, ■ Południowe. Intensywność zaciemnienia odpowiada wartości TSI. Skala: 47  60

	maj	lipiec	sierpień	wrzesień
Mamry	47	48	49	52
Kisajno	47	47	50	49
Niegocin	53	53	56	56
Tałowisko	56	55	54	52
Tały	59	58	57	57
Mikołajskie	60	56	59	58
Śniardwy	53	56	56	60
Bełdany	59	57	57	58

Najniższe wartości TSI (47-52) odnotowano w jeziorach Mamry i Kisajno, należących do grupy jezior Północnych. Najwyższe wartości (53-60) obserwowano w jeziorach Mikołajskie i Śniardwy z grupy Południowej. Porównano też średnie wartości TSI dla trzech wyodrębnionych grup jezior. W jeziorach Północnych średnia wartość TSI była najniższa i wynosiła 49, w grupie Środkowej 55, natomiast w Południowej średnia wartość TSI była najwyższa i wynosiła 57. Analiza wariancji rang Kruskal-Wallis’a wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami (Rys. 13a). Wyodrębnione na podstawie analizy skupień grupy jezior były różne pod względem stanu troficznego.

Porównano również średnie wartości TSI dla lat 2011-2013, w których prowadzone były badania (wartości TSI uśrednione z pomiarów w ośmiu badanych jeziorach, z miesięcy maj, lipiec, sierpień w każdym roku). Najniższe średnie wartości TSI odnotowano w roku 2012 (52), natomiast w latach 2011 i 2013 średnie TSI wynosiły odpowiednio 55 i 56. Analiza statystyczna w tym przypadku nie wykazała jednak istotnych różnic pomiędzy średnimi wartościami TSI w każdym roku badawczym (Rys. 13b).

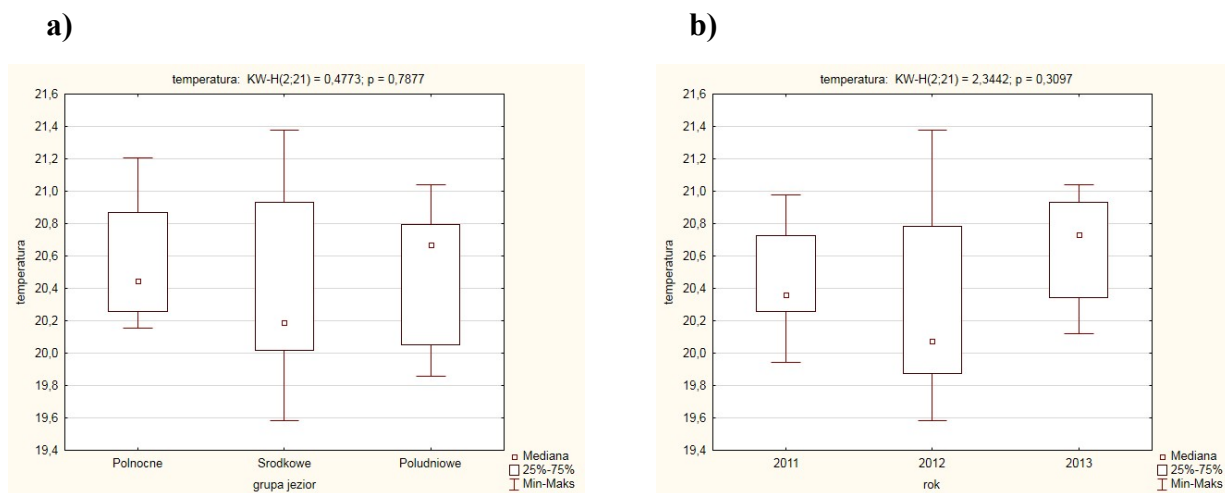


Rysunek 13. Wykresy wyznaczone podczas analizy ANOVA rang Kruskal-Wallis'a: a) zakres wartości TSI dla trzech grup jezior: Północnej, Środkowej i Południowej (z pomiarów w latach 2011, 2012 i 2013), b) zakres wartości TSI dla trzech sezonów badawczych: 2011, 2012 i 2013 (z pomiarów w ośmiu badanych jeziorach).

Ważnym czynnikiem mogącym wpływać na różnorodność populacji cyjanobakterii w badanych jeziorach mogła być temperatura wody. Sprawdzono, czy istniały statystycznie istotne różnice pomiędzy temperaturą wody przy powierzchni (mierzoną na głębokości 0,5 m, w ośmiu badanych jeziorach) w latach badań 2011, 2012 i 2013. Pod uwagę brano pomiary z miesięcy letnich (lipiec i sierpień), ponieważ wtedy występuje największe prawdopodobieństwo występowania zakwitów sinic. Zbadano również, czy istotne różnice w temperaturze wody występowały pomiędzy wyznaczonymi grupami jezior (Północną, Środkową i Południową).

Średnia temperatura wody powierzchniowej w lecie w roku 2011 wynosiła 20,5°C, w roku 2012 - 20,3°C, natomiast w roku 2013 - 20,6°C. Analiza wariancji nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi temperaturami w badanych latach (Rys. 14b).

Natomiast średnie temperatury wody w grupach Północnej, Środkowej i Południowej wynosiły odpowiednio 20,6 °C, 20,4 °C i 20,5 °C (średnia z pomiarów z lipca i sierpnia z trzech lat badawczych) i w tym przypadku również nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi (Rys. 14a).



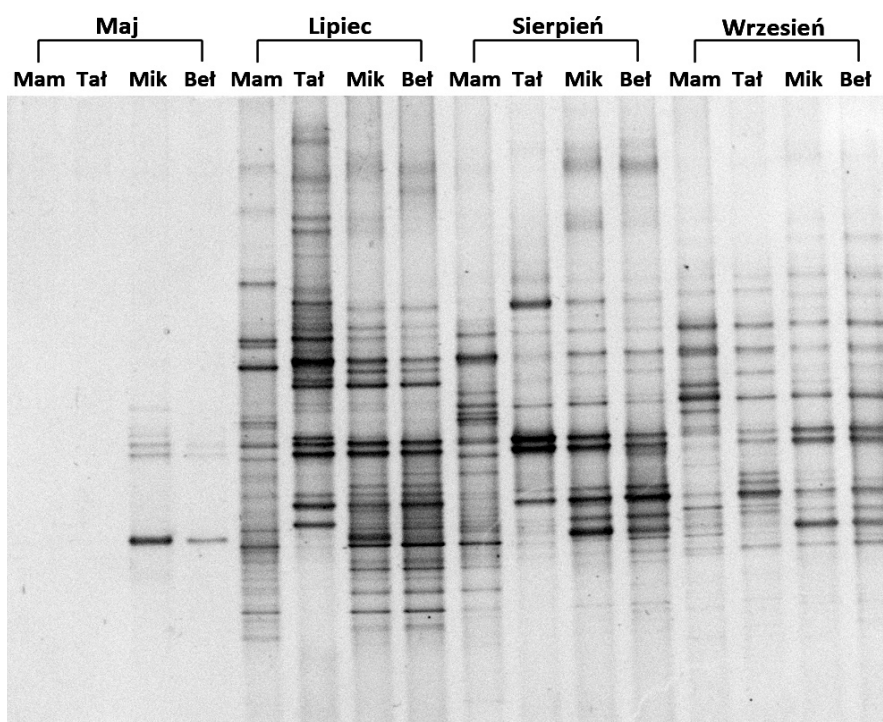
Rysunek 14. Wykresy wyznaczone podczas analizy ANOVA rang Kruskal-Wallis'a: a) zakres wartości temperatury wody powierzchniowej dla trzech grup jezior: Północnej, Środkowej i Południowej (z pomiarów w lipcu i sierpniu 2011, 2012 i 2013 r.), b) zakres temperatur wody powierzchniowej ośmiu badanych jezior w miesiącach letnich dla sezonów badawczych: 2011, 2012 i 2013.

5.2. Obecność i różnorodność cyjanobakterii w badanych jeziorach w systemie Wielkich Jezior Mazurskich

5.2.1. Skład taksonomiczny cyjanobakterii

5.2.1.1. Porównanie dwóch metod oznaczania składu taksonomicznego cyjanobakterii – metody mikroskopowej i metody DGGE-ITS

Klasyczna metoda badania składu taksonomicznego cyjanobakterii w wodzie opiera się na obserwacjach mikroskopowych (Utermöhl 1958). Z wynikami metody mikroskopowej porównywano wyniki oznaczania składu taksonomicznego cyjanobakterii uzyskane metodami biologii molekularnej - DGGE-ITS, a następnie sekwencjonowaniem wyciętych z żelu prążków. Wyniki analizy DGGE przedstawia Rysunek 15. Jeśli była taka możliwość, z żelu wycinano i sekwencjonowano co najmniej po dwa prążki znajdujące się na tej samej wysokości w żelu (odpowiadające jednej OTU). Badania przeprowadzono na próbach wody z czterech jezior: Mamry, Tałtowisko, Mikołajskie, Bełdany, pobieranej w maju, lipcu, sierpniu i wrześniu 2011 r.



Rysunek 15. Zdjęcie żelu z analizy DGGE-ITS z czterech jezior badanych w 2011 roku. Mam – Mamry, Tał – Tałtowisko, Mik – Mikołajskie, Beł – Bełdany

Porównano liczbę taksonów wykrytą w poszczególnych próbkach za pomocą badań mikroskopowych i liczbę OTU uzyskanych w analizie DGGE-ITS (Tab. 9). Największą liczbę taksonów (29) w przypadku analizy mikroskopowej wykryto w próbce wody pobranej w sierpniu z jeziora Tałtowisko, najmniejszą zaś (6), w próbce z jeziora Beldany w maju. W DGGE największą liczbę OTU (29) zaobserwowano w jeziorze Mikołajskim w lipcu, natomiast dla próbek majowych z jezior Mamry i Tałtowisko nie zaobserwowano na żelu żadnych prążków. Średnio za pomocą analiz molekularnych znajdowano o 3,2 mniej OTU, niż taksonów w analizie mikroskopowej.

Tabela 9. Porównanie liczby taksonów w analizach mikroskopowych i liczby prążków otrzymanej w analizie DGGE-ITS

		Liczba taksonów (mikroskop)	Liczba OTU (DGGE-ITS)
Maj	Mamry	7	0
	Tałowisko	9	0
	Mikołajskie	7	6
	Beldany	6	3
Lipiec	Mamry	20	24
	Tałowisko	27	20
	Mikołajskie	20	29
	Beldany	23	22
Sierpień	Mamry	22	27
	Tałowisko	29	17
	Mikołajskie	24	16
	Beldany	25	20
Wrzesień	Mamry	27	20
	Tałowisko	20	16
	Mikołajskie	17	17
	Beldany	20	15

Za pomocą analiz mikroskopowych we wszystkich badanych próbkach wykryto cyjanobakterie należące łącznie do 44 taksonów (18 nitkowatych i 26 kokoidalnych), z czego 39 oznaczono do poziomu gatunku, a pozostałe 5 do rodzaju. Łącznie wykryto cyjanobakterie należące do 20 różnych rodzajów (Tab. 10).

Analiza DGGE pozwoliła na uzyskanie łącznie we wszystkich próbach 44 różnych OTU. Dla 43 z nich udało się uzyskać sekwencję amplifikowanego fragmentu ITS. W Tabeli 11 przedstawiono numery akcesyjne do bazy danych GenBank. W bazie danych umieszczono

34 sekwencje, pozostałe 9 było zbyt krótkich. Sekwencje ITS otrzymane w niniejszych badaniach znajdują się w Załączniku 2.

Tabela 10. Porównanie taksonów zidentyfikowanych na podstawie analiz mikroskopowych i analizy DGGE-ITS

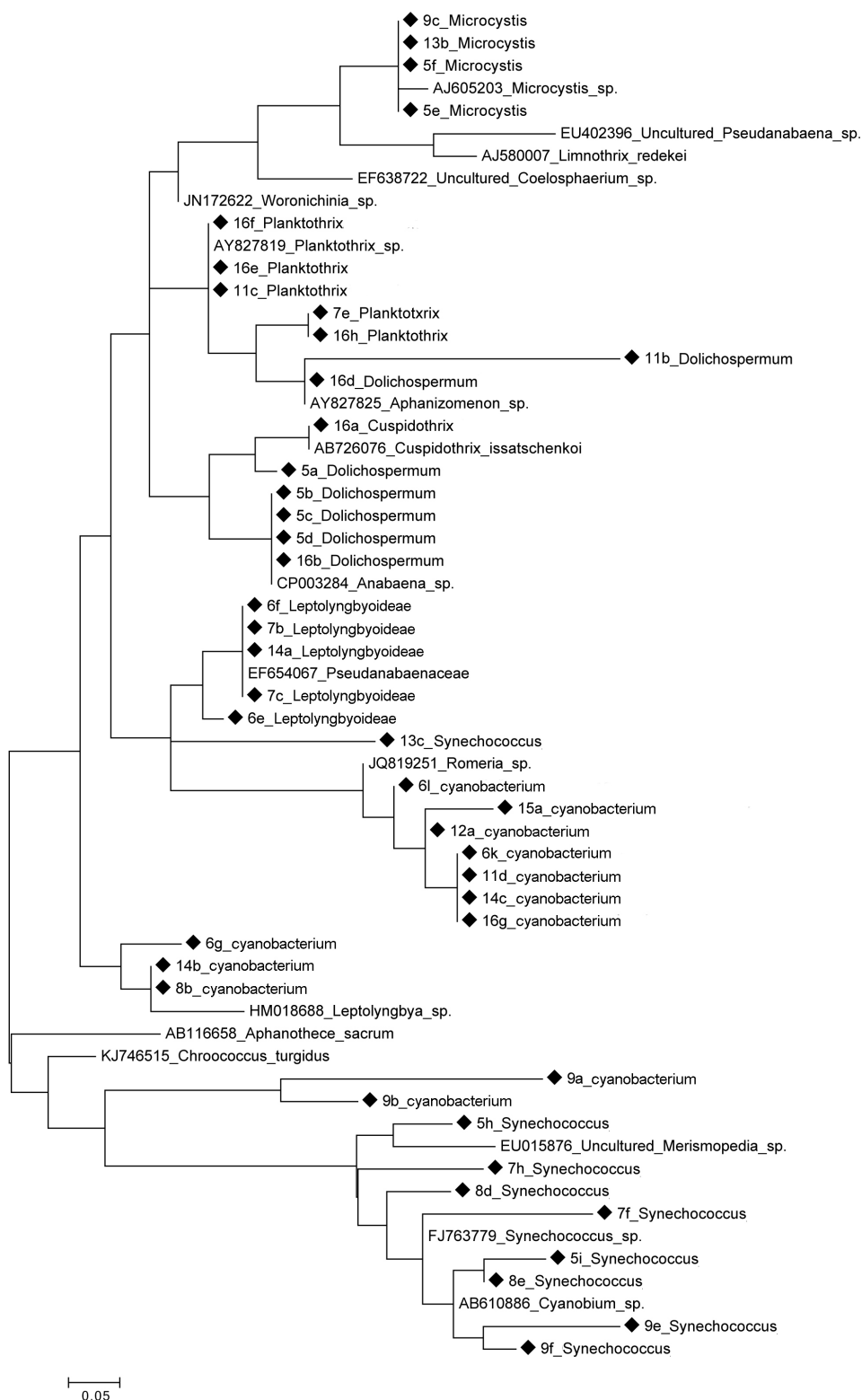
Analiza mikroskopowa	DGGE-ITS
kokoidalne	
<i>Aphanocapsa</i> spp.	
<i>Aphanothece</i> spp.	
<i>Chroococcus</i> spp.	
<i>Coelosphaerium</i> spp.	
<i>Cyanodictyon</i> spp.	
<i>Lemmermanniella pallida</i>	
<i>Merismopedia</i> spp.	
<i>Rhabdoderma lineare</i>	
<i>Snowella</i> spp.	
<i>Synechococcus</i> -like/ <i>Cyanobium</i> -like	<i>Synechococcus</i>
<i>Woronichinia</i> spp.	
<i>Microcystis</i> spp.	<i>Microcystis</i>
nitkowate	
<i>Aphanizomenon</i> spp.	
<i>Cuspidothrix issatshenkoi</i>	<i>Cuspidothrix</i>
<i>Dolichospermum</i> spp. (d. <i>Anabaena</i> spp.)	<i>Dolichospermum</i> (d. <i>Anabaena</i>)
<i>Limnothrix</i> spp.	
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	<i>Leptolyngbyoideae</i>
<i>Pseudanabaena</i> spp.	
<i>Romeria gracilis</i>	
<i>Planktothrix</i> spp.	<i>Planktothrix</i>
	sekwencje nieklasyfikowane

W celu identyfikacji taksonów, do których należą uzyskane sekwencje ITS stworzono drzewo filogenetyczne, metodą maksymalnego pokrewieństwa (maximum likelihood), na którym umieszczono badane sekwencje, jak również inne sekwencje ITS z bazy GenBank, należące do taksonów, które występują w Wielkich Jeziorach Mazurskich (Rys. 16). Przeprowadzono również analizę porównawczą badanych sekwencji z sekwencjami z bazy GenBank za pomocą programu BLAST. Większość uzyskanych sekwencji zaklasyfikowano do 5 różnych rodzajów (*Cuspidothrix*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Synechococcus*) i jednej podrodziny (*Leptolyngbyoideae*) (Tab. 10). Część uzyskanych sekwencji sklasyfikowano tylko jako należące do *Cyanobacteria*.

Porównanie taksonów wykrytych za pomocą analiz mikroskopowych oraz analizy DGGE-ITS przedstawia Tabela 10. Obiema metodami potwierdzono obecność nitkowatych rodzajów cyjanobakterii takich jak *Cuspidothrix*, *Dolichospermum* i *Planktothrix*. Cyjanobakteriom należącym do *Planktolynghya* sp., wykrytym w analizie mikroskopowej odpowiadają natomiast sekwencje zaklasyfikowane do podrodziny *Leptolynghyoideae* w analizie DGGE-ITS. W przypadku cyjanobakterii kokoidalnych dwiema metodami została potwierdzona obecność *Microcystis* i *Synechococcus* spp. Za pomocą analiz molekularnych nie wykryto pozostałych taksonów kokoidalnych, których komórki znajdowano w analizie mikroskopowej. Analiza mikroskopowa pozwoliła więc na oznaczenie większej ilości taksonów z większą dokładnością – do poziomu gatunku lub rodzaju.

Tabela 11. Sekwencje uzyskane w analizie DGGE-ITS, numery sekwencji nadane podczas analiz, oraz numery akcesyjne do bazy GenBank

Takson	Nazwa sekwencji i numer w bazie GenBank
<i>Cuspidothrix</i>	16a_KF207588
<i>Dolichospermum</i> (d. <i>Anabaena</i>)	5a_KF207559, 5b_KF207560, 5c_KF207561, 5d_KF207562, 16b_KF207589, 16d_KF207590
<i>Microcystis</i>	5e_KF207563, 5f_KF207564, 9c, 13b_KF207583
<i>Leptolynghyoideae</i>	6e_KF207566, 6f_KF207567, 7b_KF207570, 7c_KF207571, 14a_KF207585
<i>Planktothrix</i>	7e_KF207572, 11b_KF207581, 11c_KF207582, 16e_KF207591, 16f, 16h_KF207592
<i>Synechococcus</i>	5i, 5h_KF207565, 7f_KF207573, 7h_KF207574, 8d_KF207576, 8e_KF207577, 9e_KF207579, 9f_KF207580, 13c_KF207584
Nieklasyfikowane sekwencje	
<i>Cyanobacteria</i>	6g_KF207568, 6l_KF207569, 6k, 8b_KF207575, 9a_KF207578, 9b, 11d, 12a, 14b_KF207586, 14c_KF207587, 15a, 16g



Rysunek 16. Drzewo filogenetyczne otrzymane metodą największej wiarygodności (ang. maximum likelihood), model GTR, sekwencji cyjanobakterii z Jezior Mazurskich, uzyskanych w analizie DGGE-ITS.

◆ - sekwencje z analizy DGGE-ITS; pozostałe sekwencje pochodzą z bazy GenBank

5.2.1.2. Porównanie czułości obydwu używanych metod oznaczania składu taksonomicznego cyjanobakterii

W przeprowadzonych badaniach metoda mikroskopowa Utermöhl'a pozwalała na identyfikację taksonów, których zagęszczenie było mniejsze niż 1 komórka/ml (np. *Microcystis wesenbergii*, jezioro Beldany, lipiec – 0,2 kom/ml). Sprawdzono, przy jakich zagęszczeniach komórek, wykrytych za pomocą analizy mikroskopowej, jest możliwe wykrycie badanych taksonów w metodzie DGGE-ITS. Do tego celu użyto dwóch taksonów – nitkowatego rodzaju *Planktothrix* oraz kokoidalnego *Microcystis*. Są to dwa ważne taksony, ponieważ obydwa mogą być potencjalnie toksyczne. Występują one powszechnie w badanych jeziorach, lecz w zmiennych liczebnościach, co czyni je odpowiednim modelem do takiej analizy. Liczebności komórek w analizie mikroskopowej, oraz odpowiadającą im obecność lub brak prążków dla danego taksonu w analizie DGGE-ITS przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Porównanie liczebności komórek *Planktothrix* spp. i *Microcystis* spp. identyfikowanych metodą mikroskopową z obecnością na żelu DGGE-ITS prążków odpowiadających tym dwóm taksonom.

Miesiąc	Jezioro	<i>Microcystis</i>		<i>Planktothrix</i>	
		mikroskop (kom/ml)	DGGE-ITS	mikroskop (kom/ml)	DGGE-ITS
Maj	Mamry	-	-	62	-
	Tałtowisko	-	-	76	-
	Mikołajskie	-	-	58	+
	Beldany	-	-	-	+
Lipiec	Mamry	71	+	-	-
	Tałtowisko	4	-	4285	+
	Mikołajskie	<1	-	1900	+
	Beldany	6	-	928	+
Sierpień	Mamry	34	+	-	-
	Tałtowisko	28	-	6209	+
	Mikołajskie	7	-	2120	+
	Beldany	3	-	2660	+
Wrzesień	Mamry	32	+	-	+
	Tałtowisko	-	-	-	+
	Mikołajskie	-	-	885	+
	Beldany	4	-	2370	+

Detekcja *Microcystis* spp. w metodzie DGGE-ITS była możliwa, jeśli liczebność komórek z tego rodzaju była większa niż 30 kom/ml. Takie liczebności komórek były obecne w trzech badanych próbkach wody – Mamry: lipiec, sierpień i wrzesień. Przy niższych liczebnościach *Microcystis* spp. nie było wykrywane w metodzie molekularnej, a więc na żelu DGGE nie znajdowano prążków odpowiadających *Microcystis* spp.

Dla *Planktothrix* spp. nie udało się precyzyjnie wyznaczyć minimalnego zagęszczenia, przy którym rodzaj ten może być wykryty w analizie DGGE-ITS. Przy liczebnościach rzędu kilkuset lub kilku tysięcy kom/ml prążki odpowiadające *Planktothrix* spp. były zawsze znajdowane na żelu DGGE. Przy liczebnościach niższych niż 100 kom/ml prążki na żelu nie zawsze były widoczne (np. Tałtowisko maj). Ponadto w trzech próbkach, w których nie zanotowano obecności *Planktothrix* spp. w badaniach mikroskopowych, na żelu DGGE pojawiały się prążki wskazujące na obecność *Planktothrix* spp. (np. Beldany maj).

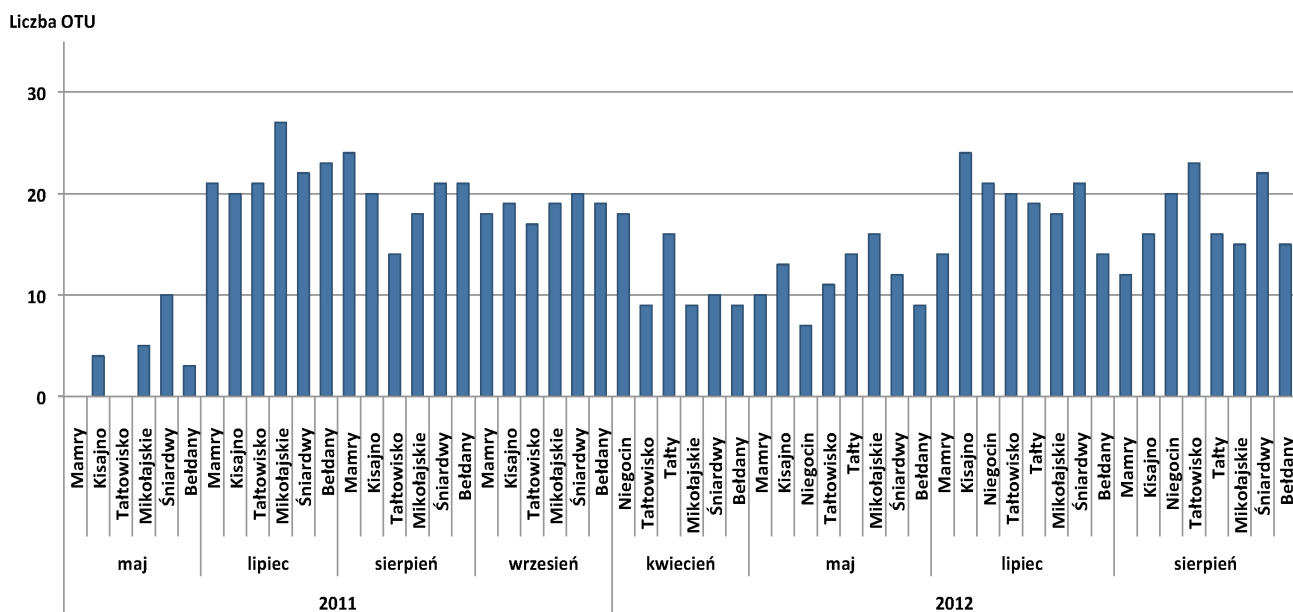
5.2.2. Zmienność mazurskich populacji cyjanobakterii w czasie i przestrzeni

Elektroforetyczny rozdział w gradiencie denaturującym zamplifikowanego fragmentu ITS (DGGE-ITS) posłużył również do oceny różnorodności mazurskich populacji cyjanobakterii, a także prześledzenia zmian w nich zachodzących w czasie sezonu wegetacyjnego oraz pod wpływem różnych czynników środowiskowych. Analizowano próbki wody z maja, lipca, sierpnia i września 2011 roku oraz z kwietnia, maja, lipca i sierpnia 2012 roku, pobierane z jezior: Mamry, Kisajno, Niegocin, Tałtowisko, Tałty, Mikołajskie, Śniardwy i Beldany.

Ogółem dla wszystkich badanych próbek uzyskano 44 różne OTU. Najwięcej OTU (27) otrzymano w próbce z lipca 2011 r. z jeziora Mikołajskie, natomiast w dwóch próbkach: Mamry maj 2011 r. i Tałtowisko maj 2011 r. nie uzyskano ani jednego OTU. Średnią liczbę OTU w poszczególnych miesiącach przedstawiono w Tabeli 13. Najniższe bogactwo taksonomiczne odnotowywano w próbkach z maja, najwyższe natomiast w próbkach lipcowych. Rysunek 17 przedstawia wykres bogactwa taksonomicznego cyjanobakterii we wszystkich badanych próbkach.

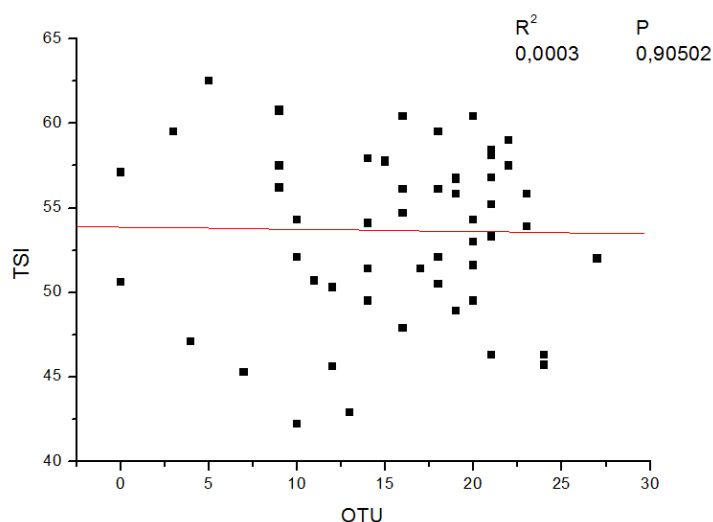
Tabela. 13 Bogactwo taksonomiczne cyjanobakterii wyrażone średnią liczbą OTU w analizie DGGE-ITS w kolejnych miesiącach sezonu wegetacyjnego (wyniki uśrednione z próbek pobieranych w latach 2011 i 2012)

Miesiąc	Średnia liczba OTU
kwiecień	12
maj	8
lipiec	20
sierpień	18
wrzesień	19



Rysunek 17. Bogactwo taksonomiczne cyjanobakterii wyrażone liczbą OTU otrzymaną w analizie profili żelowych DGGE-ITS w próbkach z Jezior Mazurskich z 2011 i 2012 roku.

Analiza bogactwa taksonomicznego wykazała brak zależności pomiędzy liczbą OTU, a więc ilością taksonów cyjanobakterii w badanej próbce, a aktualnym stanem troficznym jeziora, wyrażonym indeksem stanu troficznego (TSI) (Rys. 18).



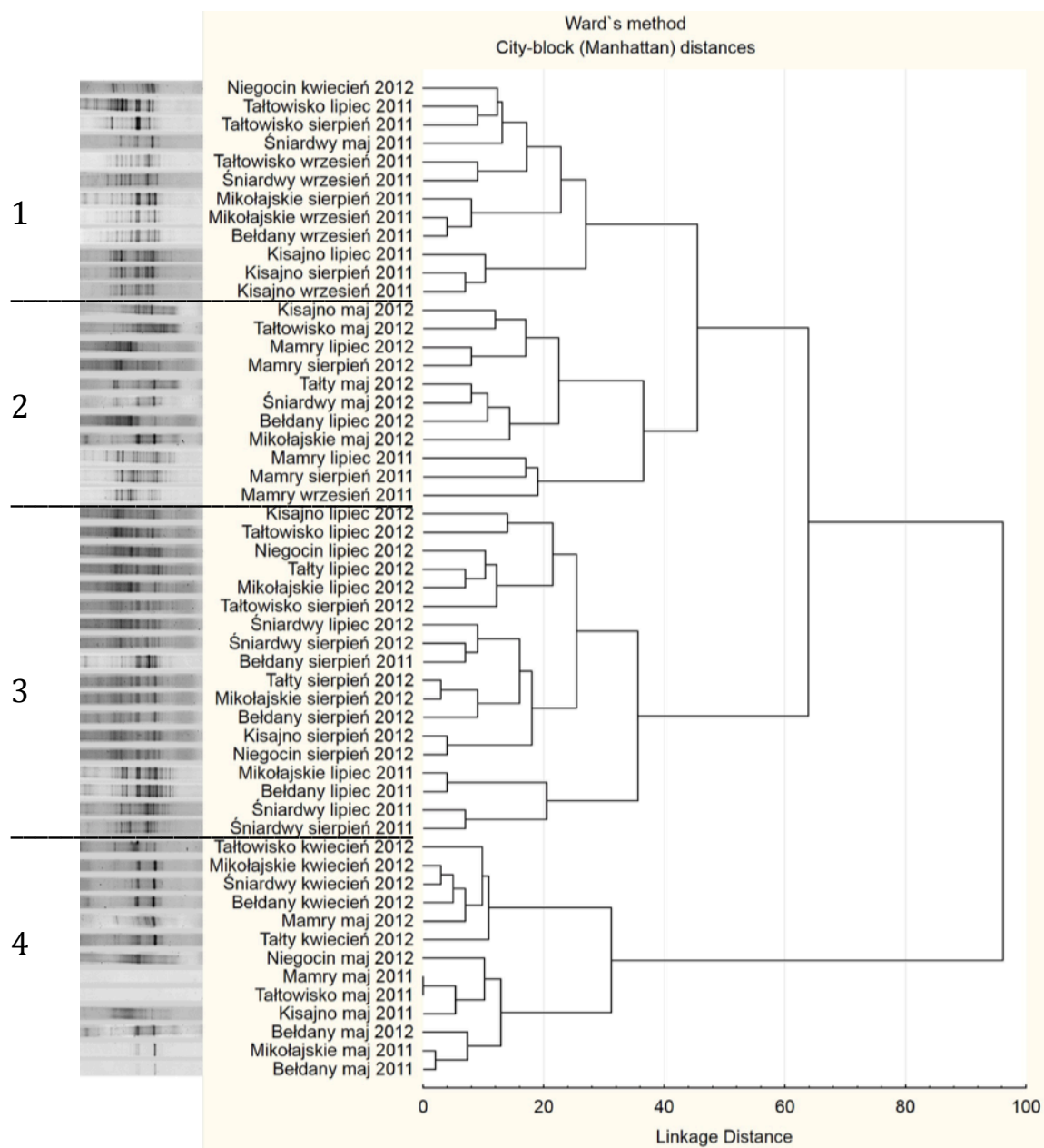
Rysunek 18. Wykres regresji liniowej pomiędzy liczbą OTU w analizie DGGE-ITS a aktualnymi wartościami indeksu stanu troficznego w badanych próbkach wody jeziornej.

Na podstawie profili prążkowych otrzymanych w analizie DGGE-ITS wyznaczono dendrogram grupujący próbki o najbardziej zbliżonej do siebie strukturze taksonomicznej cyjanobakterii (Rys. 19). Analiza ta wykazała istnienie czterech głównych klastrow, oznaczonych na Rysunku 19 cyframi 1-4. Otrzymane wyniki wskazują, że badane populacje cyjanobakterii nie grupują się ze względu na jezioro z którego pochodzą. W klastrze 1 znajdują się próbki z sześciu różnych jezior, w klastrze 2 z siedmiu, a w klastrach 3 i 4 odpowiednio z sześciu i ośmiu jezior (na osiem badanych).

Biorąc pod uwagę grupy jezior (Północną, Środkową i Południową), wyznaczone podczas analiz tła środowiskowego, dendrogram z analizy DGGE-ITS również nie odzwierciedla tego podziału. W każdym z czterech wyznaczonych klastrow znajdują się próbki pochodzące z każdej z trzech grup jezior. Populacje cyjanobakterii nie grupują się więc także pod względem warunków fizyko-chemicznych i biologicznych panujących w jeziorze, na podstawie których stworzone zostały grupy Północna, Środkowa i Południowa. Położenie geograficzne jeziora również nie ma wpływu na grupowanie się podobnych populacji

cyjanobakterii – nawet próbki z sąsiadujących ze sobą jezior mogą znajdować się w różnych klastrach.

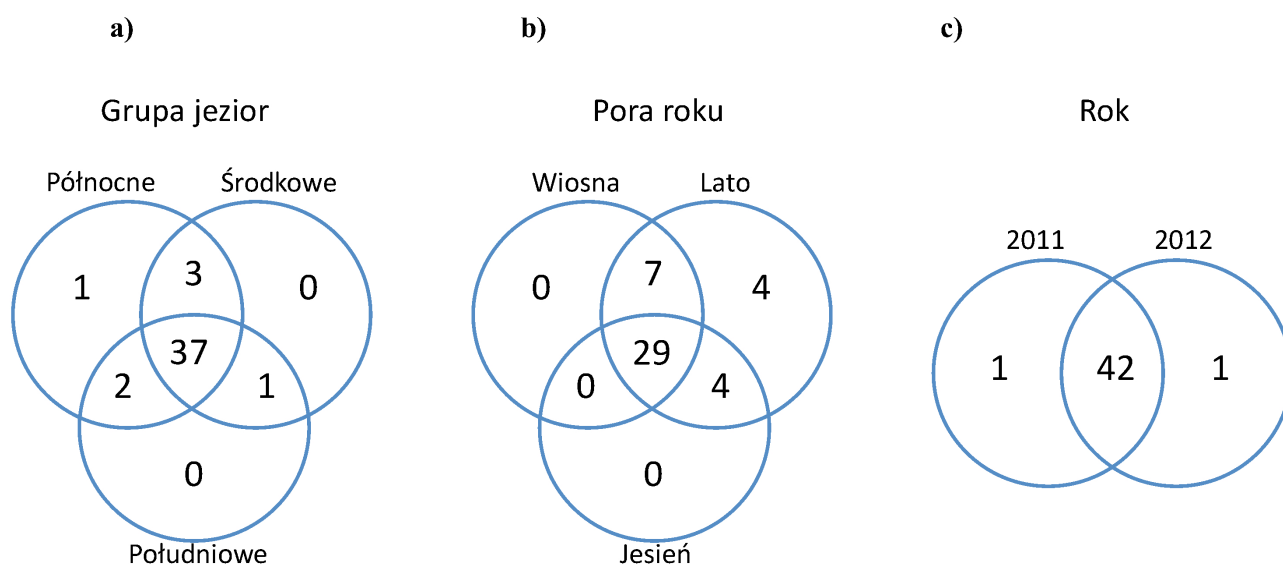
Czynnikiem, który w największym stopniu wpływa na kwalifikowanie populacji cyjanobakterii z badanych próbek do poszczególnych klastrow jest pora roku. Analiza skupień wykazała istnienie dwóch klastrow specyficznych dla danej pory roku. W klastrze 4 znajdują się wyłącznie próbki wiosenne (z miesięcy kwiecień i maj), w klastrze 3 natomiast wyłącznie próbki z miesięcy letnich (lipca i sierpnia). Prawie wszystkie próbki z jesieni (wrzesień), z wyjątkiem jednej (Mamry wrzesień 2011 r.), mieszczą się w klastrze 1, w którym to jednak oprócz próbek jesiennych znajdują się również te z innych pór roku. Najbardziej różnorodny jest klaster 2, w którym zgrupowały się próbki pochodzące z trzech pór roku.



Rysunek 19. Drzewo hierarchiczne wyznaczone metodą Warda na podstawie profili prążkowych w analizie DGGE-ITS z próbek z ośmiu Jezior Mazurskich z 2011 i 2012 roku. Odległości obliczono metodą miejską (Manhattan). Cyframi 1-4 oznaczono cztery wyodrębnione klastry.

Z całkowitej liczby 44 OTU, wykrytych w jeziorach mazurskich na podstawie DGGE-ITS, połowa (22) pojawiała się we wszystkich ośmiu badanych jeziorach. Tylko jedna OTU była unikatowa i występowała tylko w jednym jeziorze Mamry.

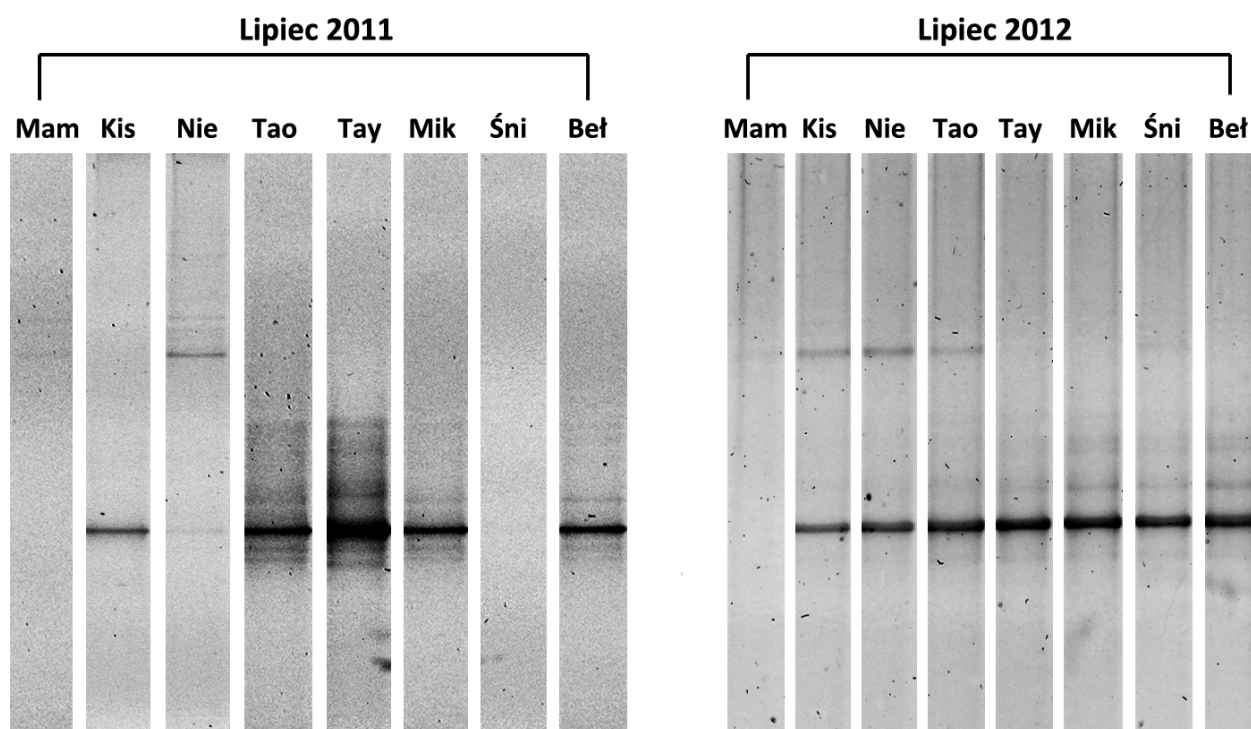
Biorąc pod uwagę podział na grupy Północną, Środkową i Południową, zdecydowana większość, a więc 37 OTU występowało we wszystkich trzech grupach jezior. Jedna OTU była unikatowa dla grupy Północnej, nie stwierdzono natomiast unikatowych OTU dla grupy Środkowej lub Południowej. 3 OTU występowały w grupach Północnej i Środkowej, 2 OTU w grupach Północnej i Południowej, natomiast jedna OTU w grupach Środkowej i Południowej (Rys. 20a). Zbadano również, czy istnieją OTU specyficzne tylko dla danych pór roku. W trzech badanych porach roku (wiosna, lato, jesień) występowało 29 OTU. Tylko dla lata znaleziono unikatowe OTU (4), które nie pojawiały się w innych porach roku. Stwierdzono natomiast 7 OTU, które występowały tylko wiosną i latem, oraz 4, które występowały latem i jesienią (Rys. 20b). Ponadto sprawdzono, czy wykryte w analizie DGGE-ITS taksony były unikatowe w danym roku badań. Dla obu lat badawczych: 2011 i 2012 wspólnych było 42 z 44 wszystkich OTU, natomiast po jednej OTU było specyficzne dla poszczególnych lat (Rys. 20c).



Rysunek 20. Liczba OTU wspólnych i unikatowych wykrytych w analizie DGGE-ITS w a) grupach jezior, b) porach roku, c) latach badawczych.

5.3. Obecność i różnorodność cyjanobakterii potencjalnie toksycznych w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

Elektroforeza w gradiencie denaturującym fragmentu genu *mcyA*, odpowiedzialnego za wytwarzanie toksyn z grupy mikrocystyn, oraz następnie sekwencjonowanie wyciętych z żelu prążków pozwoliło na weryfikację, jakie taksony cyjanobakterii, mogące wytwarzać mikrocystyny, występują w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich. Analizowano próbki z ośmiu jezior: Mamry, Kisajno, Niegocin, Tałtowisko, Tały, Mikołajskie, Śniardwy i Beldany, pobrane w maju, lipcu, sierpniu i wrześniu 2011 roku oraz w kwietniu, maju, lipcu i sierpniu 2012 roku. Rysunek 21 przedstawia zdjęcia przykładowych profili z żelu DGGE-*mcyA*, z próbek z lipca 2011 i 2012 r.

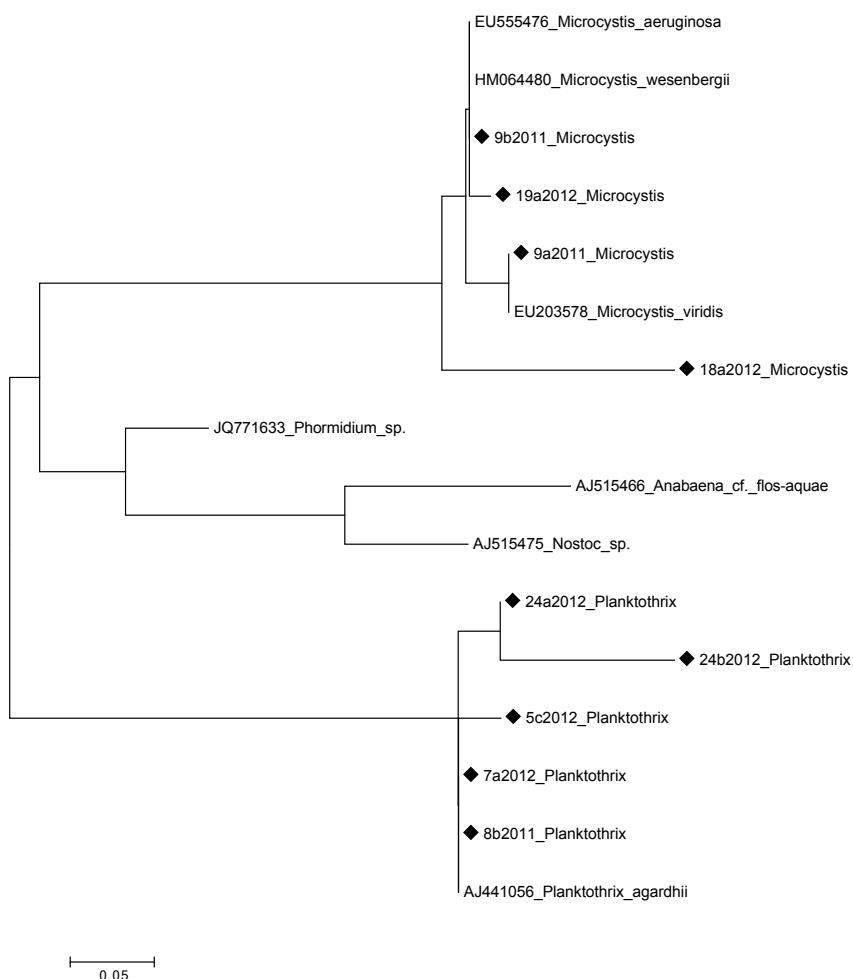


Rysunek 21. Zdjęcia żeli z analizy DGGE-*mcyA* z lipca 2011 i lipca 2012 roku.

Mam – Mamry, Kis – Kisajno, Nie – Niegocin, Tao – Tałtowisko, Tay – Tały,

Mik – Mikołajskie, Śni – Śniardwy, Beł – Beldany

Ogółem we wszystkich badanych próbkach wody wykryto 11 różnych OTU, a dla 9 z nich uzyskano sekwencję DNA. Prążki odpowiadające 2 pozostałym OTU były bardzo słabo widoczne na żelu DGGE i zawierały zbyt mało DNA, aby przeprowadzić reamplifikację i sekwencjonowanie. Otrzymanych 8 sekwencji umieszczono w bazie danych GenBank, jedna uzyskana sekwencja była zbyt krótka. Numery akcesyjne podano w Tabeli 14. Sekwencje *mcyA* otrzymane w niniejszej pracy znajdują się w Załączniku 3. Aby zidentyfikować taksony, do których należały otrzymane sekwencje przeprowadzono analizę porównawczą z innymi sekwencjami genu *mcyA*, opublikowanymi w bazie GenBank, używając programu BLAST, jak również stworzono drzewo filogenetyczne metodą maksymalnego pokrewieństwa (Rys. 22).



Rysunek 22. Drzewo filogenetyczne otrzymane metodą największej wiarygodności (ang. maximum likelihood), model GTR, sekwencji cyjanobakterii z badanych jezior systemu Wielkich Jezior Mazurskich, uzyskanych w analizie DGGE-*mcyA*.

◆ - sekwencje z analizy DGGE-*mcyA*; pozostałe sekwencje pochodzą z bazy GenBank

Tabela 14. Sekwencje uzyskane w analizie DGGE-*mcyA*, numery sekwencji nadane podczas analiz, oraz numery akcesyjne do bazy GenBank

Takson	Nazwa sekwencji i numer w bazie GenBank
<i>Microcystis</i>	9a2011_KF207596, 9b2011_KF207597, 18a2012, 19a2012_KX272759
<i>Planktothrix</i>	8b2011_KF207595, 5c2012_KX272757, 7a2012_KX272758, 24a2012_KX272761, 24b2012_KX272762

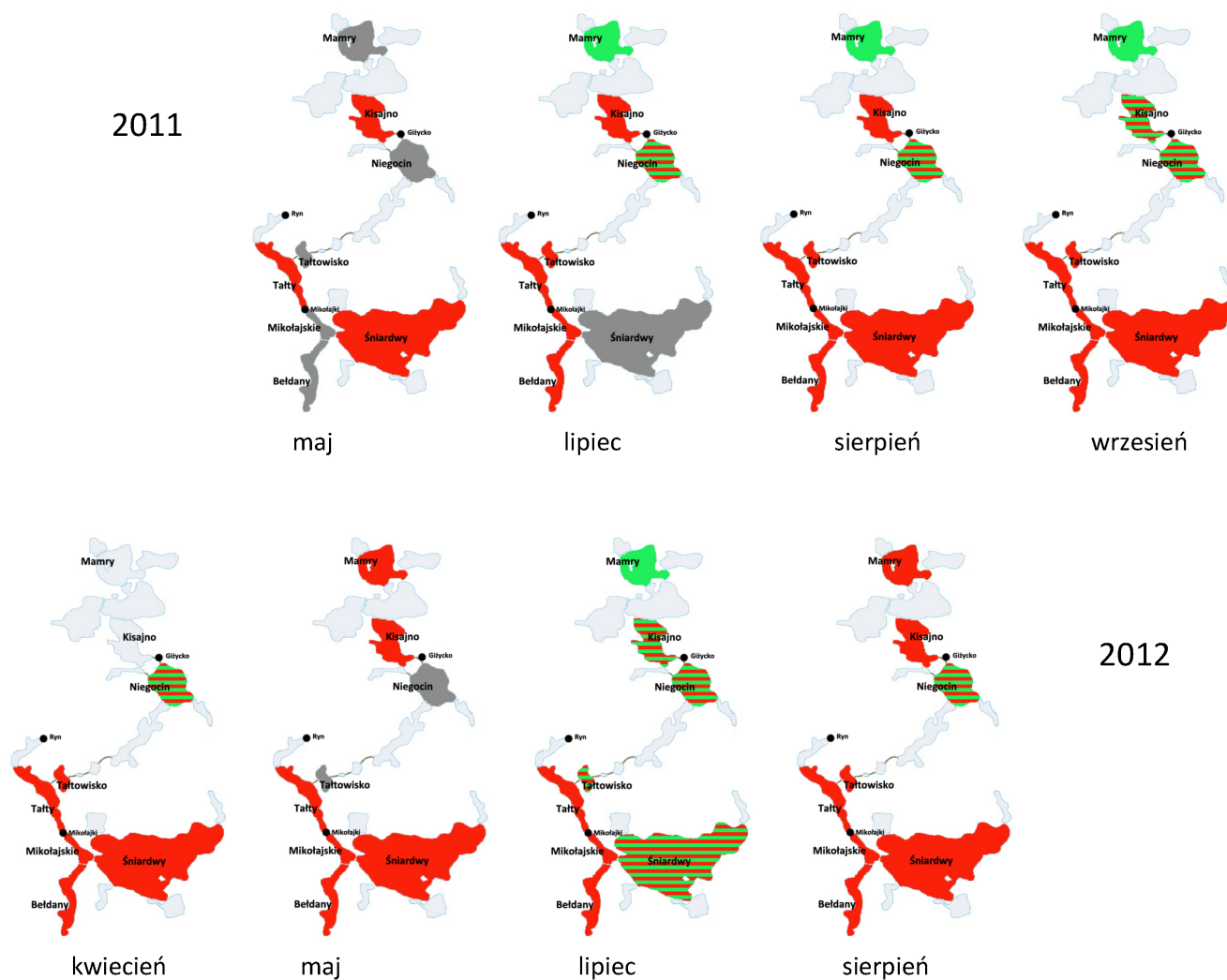
Uzyskane sekwencje fragmentu genu *mcyA* zaklasyfikowano do dwóch rodzajów cyjanobakterii: *Microcystis* (4 sekwencje) i *Planktothrix* (5 sekwencji) (Rys. 22). Prążki odpowiadające sekwencjom *Microcystis* spp. grupowały się w górnej części żelu DGGE, natomiast te odpowiadające *Planktothrix* spp. w dolnej części żelu (Rys. 21). Otrzymane wyniki wskazują, że w badanych jeziorach występują dwa rodzaje cyjanobakterii zdolnych do wytwarzania mikrocystyn – *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp.

Zmiany w występowaniu potencjalnie toksycznych taksonów w czasie i przestrzeni prześledzono nanosząc występowanie sekwencji *mcyA* charakterystycznych dla *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp. na mapy systemu Wielkich Jezior Mazurskich w poszczególnych miesiącach badawczych (Rys. 23). Geny odpowiadające za toksyczność, znajdowano w próbkach wody ze wszystkich badanych jezior. Gen *mcyA* charakterystyczny dla *Microcystis* spp. występował w pięciu jeziorach (Mamry, Kisajno, Niegocin, Tałtowisko, Śniardwy), przynajmniej w jednej próbce podczas dwuletnich badań. Natomiast gen *mcyA* charakterystyczny dla *Planktothrix* spp. odnaleziono w próbkach ze wszystkich ośmiu badanych jezior. W 32% próbek wody pobieranych wiosną nie obserwowano obecności żadnych genów odpowiadających za wytwarzanie mikrocystyn, podczas gdy w pozostałych porach roku brak genów *mcyA* stwierdzono tylko w jednej próbce (Śniardwy lipiec 2011 r.).

W roku 2011 widać wyraźny i utrzymujący się przez cały sezon wzór występowania dwóch potencjalnie toksycznych taksonów. Toksyczne szczepy *Microcystis* spp. występowały w jeziorach z grupy Północnej (Mamry, Kisajno), oraz w najbardziej wysuniętym na północ jeziorze z grupy Środkowej (Niegocin). Nie stwierdzono natomiast obecności toksycznego *Microcystis* spp. w jeziorach położonych na południe od jeziora Niegocin, a więc w pozostałych jeziorach z grupy Środkowej (Tałtowisko, Tałty), oraz w jeziorach Południowych (Mikołajskie, Śniardwy, Beldany). Toksyczne szczepy *Planktothrix* spp. były za to powszechnie obecne we wszystkich jeziorach grup Południowej i Środkowej, a także w

jeziorze Kisajno z grupy Północnej. Jedynymi jeziorami, w których współwystępowały toksyczne szczepy obydwu rodzajów były jeziora Kisajno i Niegocin, natomiast jeziorem, w którym w ogóle nie zaobserwowano toksycznych szczepów *Planktothrix* spp. było najbardziej wysunięte na północ jezioro Mamry (Rys. 23).

W roku 2012 wzór występowania potencjalnie toksycznych cyjanobakterii uległ zmianie. Zasięg obecności genów *mcyA* charakterystycznych dla *Planktothrix* spp. przesunął się na północ, obejmując również jezioro Mamry. Natomiast toksyczne szczepy *Microcystis* spp. zaobserwowano w lipcu 2012 roku również w jeziorach Tałtowisko i Śniardwy, w środkowej i południowej części systemu Wielkich Jezior Mazurskich, w których rok wcześniej nie notowano ich obecności (Rys. 23).



Rysunek 23. Występowanie potencjalnie toksycznych cyjanobakterii z rodzajów *Microcystis* i *Planktothrix*, w ośmiu badanych jeziorach w 2011 i 2012 roku, na podstawie obecności w wodzie genów *mcyA*, charakterystycznych dla tych taksonów.

■ *Microcystis* ■ *Planktothrix* ■ brak *mcyA*

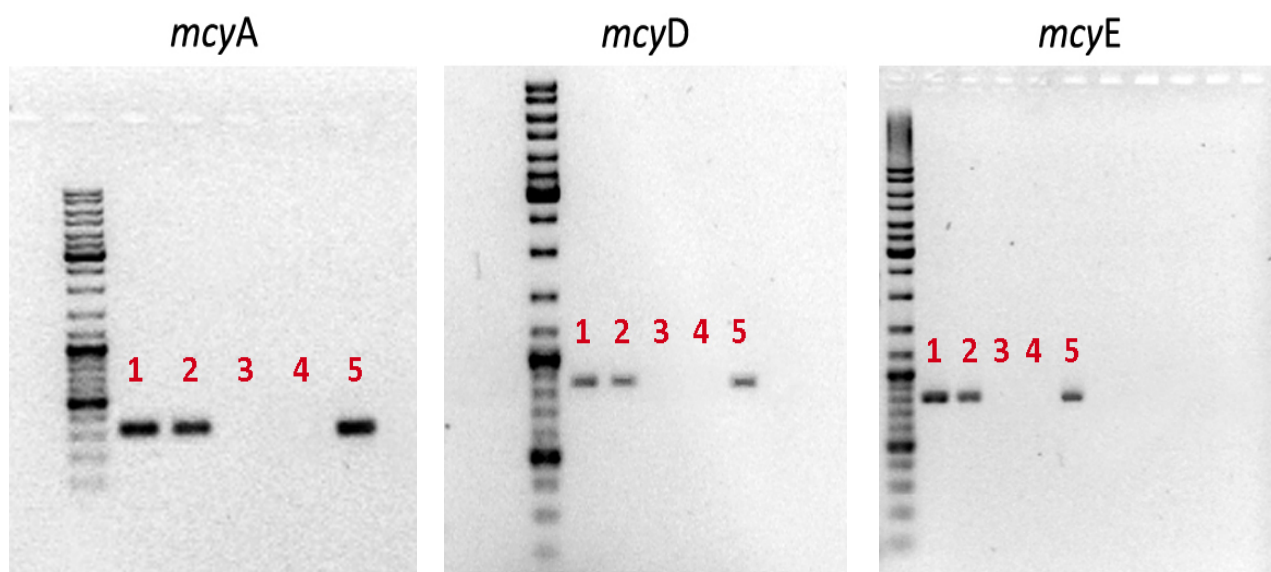
5.4. Występowanie szczepów potencjalnie toksycznych pikocyjanobakterii w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jeziorach Mazurskich

W latach 2007-2008 z jezior należących do kompleksu Wielkich Jezior Mazurskich wyizolowane zostały szczepy pikocyjanobakterii, zidentyfikowane następnie jako należące do rodzaju *Synechococcus* (Tab. 15) (Jasser i wsp. 2011, Jasser i wsp. 2013). Ponieważ nowe doniesienia literaturowe wskazują, że pikocyjanobakterie również mogą wytwarzać mikrocystyny, sprawdzono, czy szczepy z WJM posiadają w swoim genomie klaster genów *mcy*, odpowiedzialny za wytwarzanie toksyn.

Tabela 15. Miejsce izolacji oraz nazwy szczepów *Synechococcus* spp., w których sprawdzano obecność genów toksyczności.

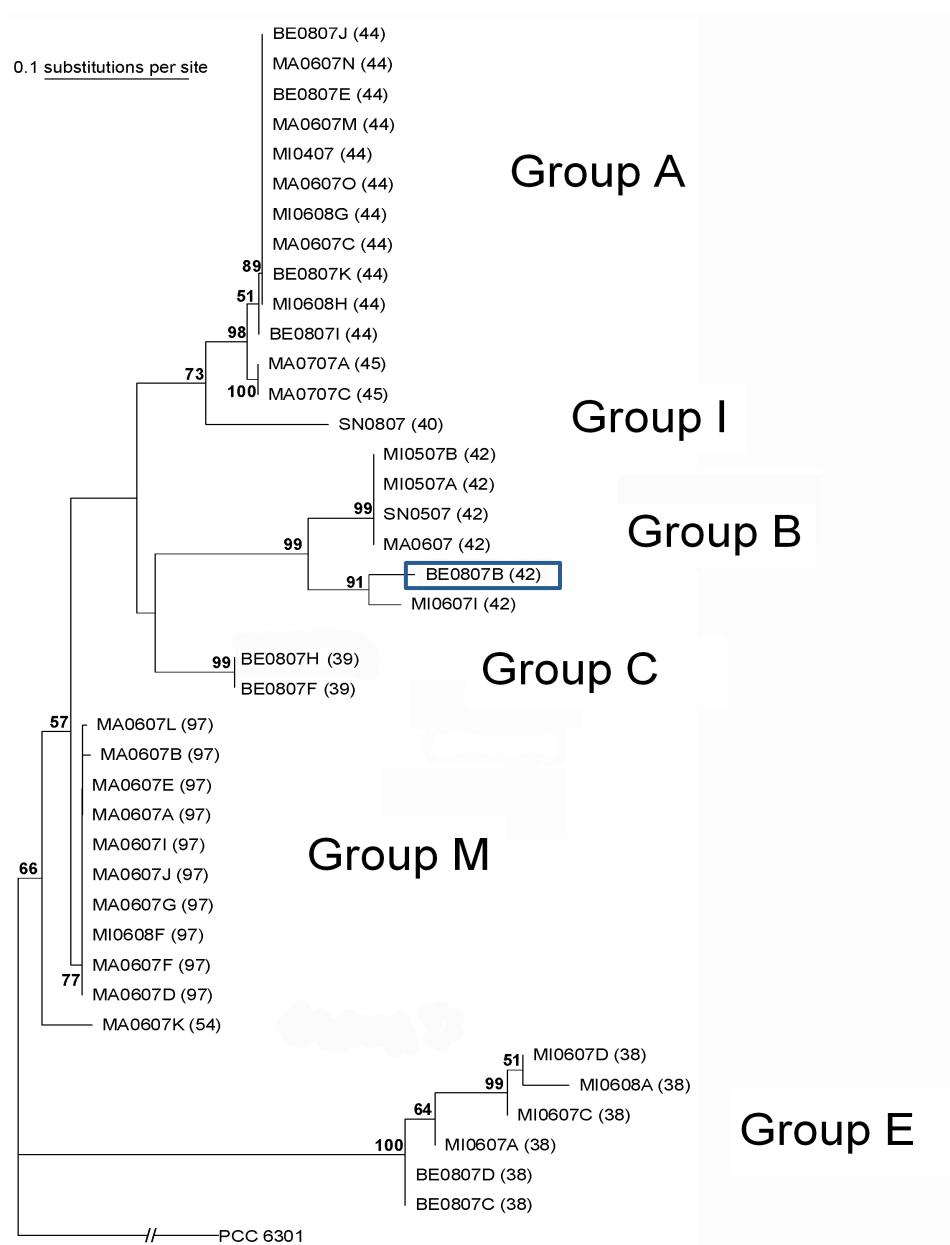
Jezioro	Nazwa szczepu
Beldany	BE0807B, BE0807C, BE0807D, BE0807E, BE0807F, BE0807H, BE0807I, BE0807J, BE0807K
Majcz	MA0607, MA0607A, MA0607B, MA0607C, MA0607D, MA0607E, MA0607F, MA0607G, MA0607I, MA0607J, MA0607K, MA0607L, MA0607M, MA0607N, MA0607O, MA0707A, MA0707C
Mikołajskie	MI0407, MI0507A, MI0507B, MI0607A, MI0607C, MI0607D, MI0607I, MI0608A, MI0608F, MI0608G, MI0608H
Śniardwy	SN0507, SN0807

DNA wyizolowano z 39 szczepów *Synechococcus* spp., a następnie sprawdzano obecność genów klastra *mcy* w oczyszczonym DNA, za pomocą starterów specyficznych dla trzech genów: *mcyA*, *mcyD* i *mcyE*. W materiale genetycznym dwóch szczepów oznaczonych jako BE0807B i BE0807H, wyizolowanych z jeziora Beldany, wykryto obecność wszystkich trzech badanych genów *mcy* (Rys. 24). W żadnym z pozostałych szczepów, nawet bardzo bliskich filogenetycznie, nie znaleziono żadnego z szukanych genów.



Rysunek 24. Obecność trzech testowanych genów *mcy* w DNA wyizolowanym ze: 1) szczepu BE0807B, 2) szczepu BE0807H, 3) i 4) blisko spokrewnionych szczepów MI0607I i BE0807F, 5) szczepu referencyjnego *Microcystis aeruginosa* CCNP1103.

Aby potwierdzić, czy materiał genetyczny izolowany ze szczepów pikocyjanobakterii nie był zanieczyszczony obcym DNA cyjanobakterii, które mogłoby zawierać również geny klastra *mcy*, przeprowadzono analizę DGGE z użyciem amplifikowanego fragmentu ITS. Wyniki analizy wykazały obecność tylko jednego prążka w przypadku szczepu BE0807B, potwierdzając, że DNA nie było zanieczyszczone. W przypadku szczepu BE0807H nie uzyskano jednoznacznego wyniku. Prążek pochodzący ze szczepu BE0807B wycięto z żelu, a następnie przeprowadzono reamplifikację i sekwencjonowanie. Otrzymana sekwencja ITS (numer w bazie GenBank: KC341754) wykazywała najwyższe podobieństwo (99%) do szczepów *Synechococcus* LM94 i BO9404 (numery w bazie GenBank: AF330248 i AF317075) z grupy filogenetycznej B (Crosbie i wsp. 2003). Wcześniejsze badania fragmentu PC-IGS tego szczepu przez Jasser i wsp. (2011) również zaklasyfikowały go grupy B (Rys. 25).



Rysunek 25. Drzewo filogenetyczne otrzymane metodą największej wiarygodności (ang. maximum likelihood), stworzone na podstawie sekwencji PC-IGS ze szczepów pikocyjanobakterii wyizolowanych z badanych jezior mazurskich przez Jasser i wsp. w 2007 r. Rysunek pochodzi z pracy Jasser i wsp. (2011). Ramkąznaczono szczep BE0807B, w którym wykryto geny klasty *mcy*.

Przeprowadzono sekwencjonowanie amplifikowanych fragmentów genów *mcyA*, *mcyD* i *mcyE* ze szczepu BE0807B. Numery akcesyjne w bazie GenBank to: KC341755 dla

fragmentu *mcyD* i KC341756 dla fragmentu *mcyE*; sekwencja fragmentu *mcyA* była za krótka na umieszczenie w bazie danych. Uzyskane sekwencje znajdują się w Załączniku 4. Spośród genów klastra *mcy*, należących do rodzajów cyjanobakterii znanych jako główni producenci mikrocyzyn, otrzymane sekwencje wykazywały największe podobieństwo do rodzaju *Planktothrix* (97-99 %), a do genów rodzaju *Microcystis* i *Dolichospermum* (d. *Anabaena*) od 70 do 80% (Tab. 16) (Bukowska i wsp. 2014b).

Tabela 16. Podobieństwo sekwencji *mcyA*, *mcyD* i *mcyE* ze szczepu *Synechococcus* sp. BE0807B z sekwencjami innych taksonów posiadających geny *mcy*.

	Takson	Numer w bazie GenBank	Podobieństwo sekwencji
<i>mcyA</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	NC010296	70%
	<i>Planktothrix agardhii</i>	AJ441056	99%
	<i>Anabaena</i> sp.	AY212249	72%
<i>mcyD</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	NC010296	81%
	<i>Planktothrix agardhii</i>	AJ441056	97%
	<i>Anabaena</i> sp.	AY212249	81%
<i>mcyE</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	NC010296	81%
	<i>Planktothrix agardhii</i>	AJ441056	99%
	<i>Anabaena</i> sp.	AY212249	80%

5.5. Analiza liczebności i udziału toksycznych genotypów *Microcystis* i *Planktothrix* spp. w całkowitej liczebności tych taksonów w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

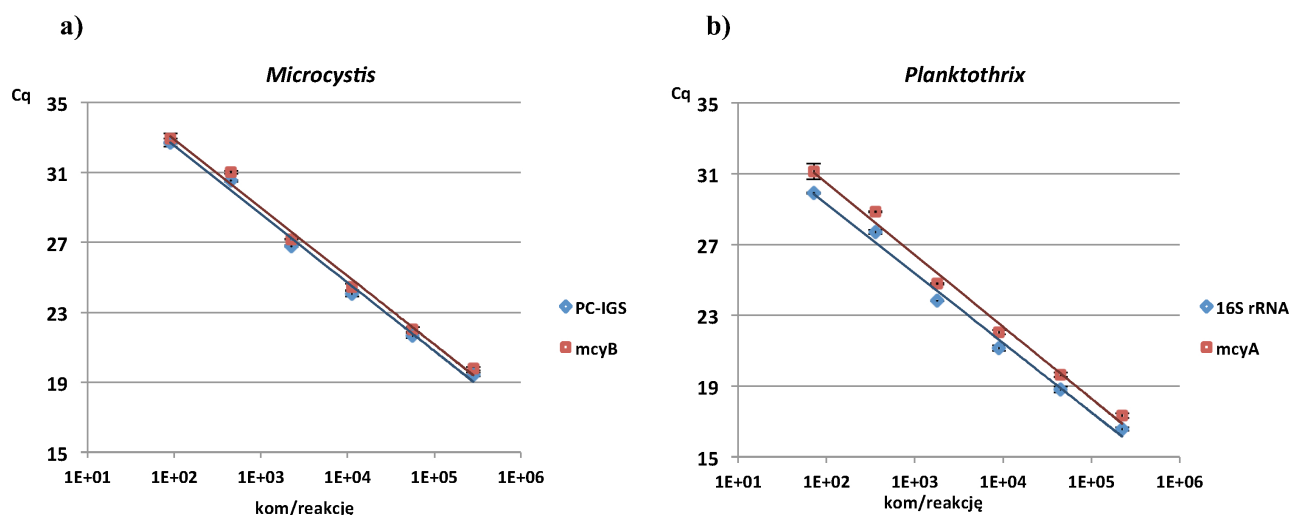
Ilościowe oznaczenie całkowitej liczebności komórek, oraz liczebności komórek potencjalnie toksycznych, w dwóch rodzajach cyjanobakterii – *Microcystis* i *Planktothrix*, u których wcześniej stwierdzono możliwość występowania genów *mcy*, było możliwe dzięki zastosowaniu metody real-time PCR (qPCR). Analizy przeprowadzano w próbkach wody z czterech wcześniej opisywanych jezior: Mamry, Tałtowisko, Mikołajskie i Śniardwy, pobranych w 2012 roku (kwiecień, maj, lipiec, sierpień), w 2013 roku (maj, lipiec, sierpień, wrzesień), oraz dodatkowo w dwóch próbkach z jeziora Ryńskie (lipiec i sierpień 2013 roku).

5.5.1. Krzywe standardowe

Do kwantyfikacji całkowitego *Microcystis* spp., potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp., całkowitego *Planktothrix* spp. i potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp. stworzono w programie LightCycler 480 Software (Roche) cztery oddzielne krzywe standardowe (Rys. 26). Parametry krzywych znajdują się w Tabeli 17. Limity detekcji w krzywych standardowych dla *Microcystis* spp. wynosiły 90-282000 komórek/reakcję, a dla *Planktothrix* spp. 72-224000 komórek/reakcję.

Tabela 17. Parametry krzywych standardowych używanych do analiz qPCR.

Target	Wydajność (%)	Nachylenie	Przecięcie z osią y	R
PC-IGS	102,8	-3,194	40,29	0,997
<i>mcyB</i>	101,9	-3,237	40,66	0,996
16S rRNA	101,3	-3,262	37,13	0,996
<i>mcyA</i>	98,9	-3,378	38,48	0,996



Rysunek 26. Krzywe standardowe do analiz qPCR. a) krzywe do kwantyfikacji całkowitej liczby *Microcystis* spp. (na podstawie fragmentu PC-IGS) i potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp. (na podstawie genu *mcyB*), b) krzywe do kwantyfikacji całkowitej liczby *Planktothrix* spp. (fragment 16s rRNA) i potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp. (*mcyA*).

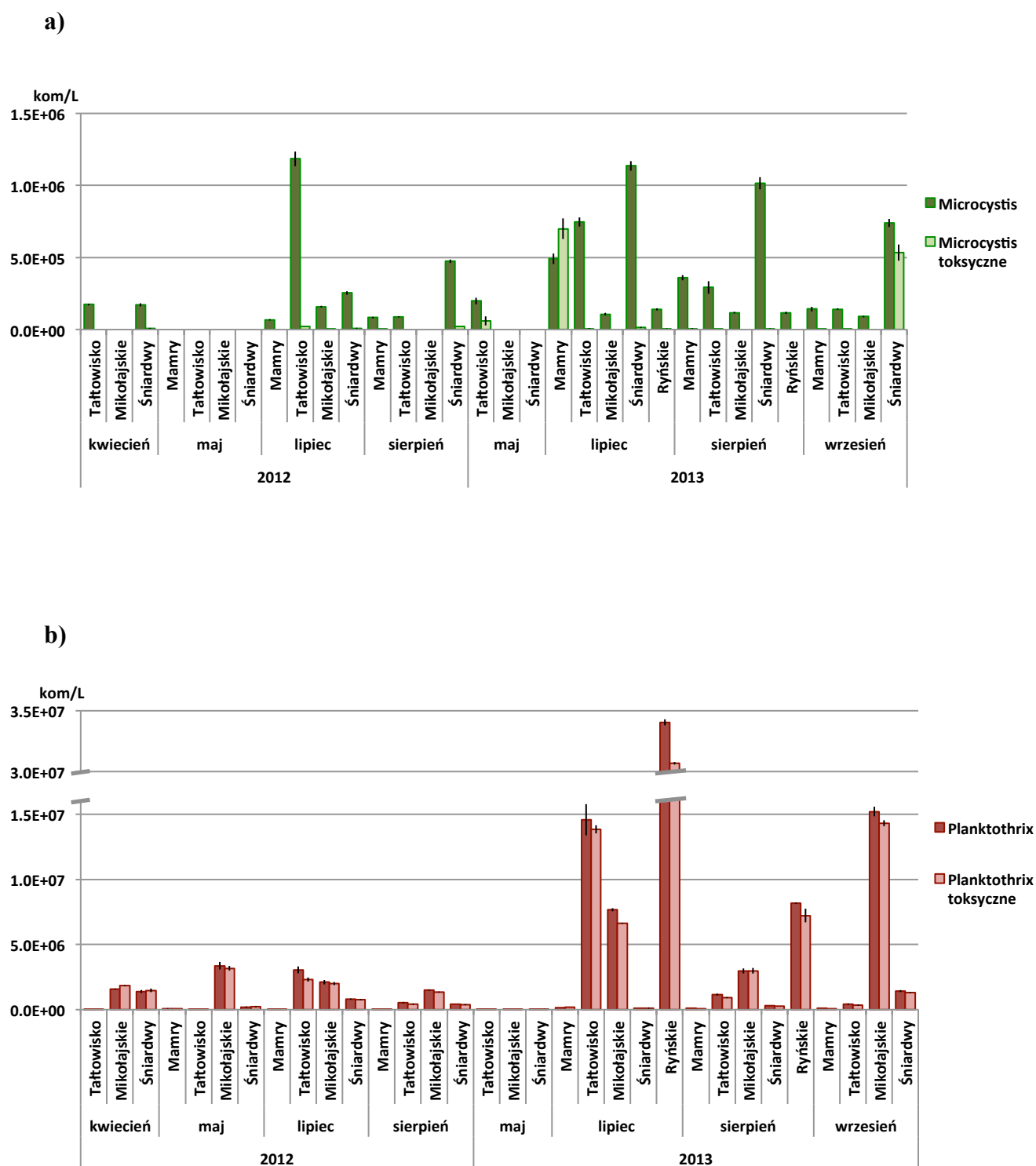
5.5.2. Testy specyficzności i inhibicji reakcji qPCR

Testy specyficzności wykazały, że DNA wyizolowane ze szczepu referencyjnego *Microcystis aeruginosa* nie daje żadnego wyniku reakcji qPCR ze starterami i sondami przeznaczonymi dla *Planktothrix* spp., jak również DNA ze szczepu referencyjnego *Planktothrix agardhii* nie daje wyniku reakcji, w przypadku zastosowania starterów i sond dla *Microcystis* spp. Ponadto badano, jak na wydajność reakcji qPCR wpływa zmieszanie matrycowego DNA z obydwu badanych rodzajów, jak również, czy na wydajność wpływa obecność w próbce innego DNA środowiskowego (w tym innych taksonów cyjanobakterii), a także ewentualnych pozostałości zanieczyszczeń z próbek środowiskowych. Wyniki testów specyficzności i inhibicji wykazały, że krzywe standardowe sporządzone ze zmieszanego DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* mogą być używane do kwantyfikacji całkowitych liczebności i liczebności potencjalnie toksycznych komórek *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp, w próbkach środowiskowych.

5.5.3. Wyniki qPCR w próbkach środowiskowych

W przypadku *Planktothrix* spp. analiza qPCR wykazała obecność tego taksonu, jak również obecność komórek potencjalnie toksycznych komórek *Planktothrix* spp. we wszystkich badanych próbkach. Całkowita liczebność wahała się od $3,8 \times 10^3$ do $3,4 \times 10^7$ kom/l, a średnia liczebność komórek we wszystkich próbkach wynosiła $3,1 \times 10^6$ kom/l. Liczebność komórek potencjalnie toksycznych wynosiła od $3,1 \times 10^3$ do $3,1 \times 10^7$ kom/l, osiągając średnią $2,9 \times 10^6$ kom/l (Rys. 27).

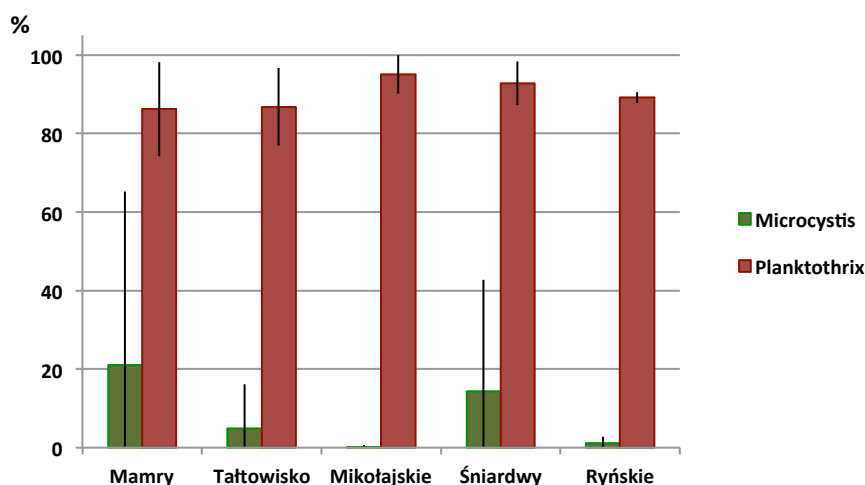
Całkowita liczebność *Microcystis* spp. w próbkach środowiskowych wahała się od 0 do $1,2 \times 10^6$ kom/l. Średnia liczebność *Microcystis* spp. we wszystkich badanych próbkach wynosiła $2,6 \times 10^5$ kom/l, czyli ponad 10 razy mniej niż w przypadku *Planktothrix* spp. Liczebność potencjalnie toksycznych komórek *Microcystis* spp. osiągała od 0 do $7,0 \times 10^5$ kom/l, lecz średnia liczebność we wszystkich próbkach wynosiła zaledwie $4,2 \times 10^4$ kom/l (Rys. 27).



Rysunek 27. Całkowita liczebność i liczebność komórek potencjalnie toksycznych a) *Microcystis* spp. i b) *Planktothrix* spp., w próbkach z badanych jezior systemu Wielkich Jezior Mazurskich, na podstawie real-time PCR.

Udział komórek potencjalnie toksycznych w całkowitej liczbie komórek *Planktothrix* spp. był we wszystkich badanych próbkach wysoki i wynosił od 75 do 100%. Średni udział toksycznych genotypów był najniższy w jeziorze Mamry (86%), a najwyższy w jeziorze Mikołajskie (95%) (Rys 28).

W przypadku *Microcystis* spp. obserwowano o wiele większą zmienność udziału potencjalnie toksycznych komórek w całkowitej liczebności tego taksonu. Wynosiła ona od 0 do 100%, ale średnio dla wszystkich próbek było to 10%. W poszczególnych jeziorach najniższy średni udział toksycznych genotypów zaobserwowano w jeziorze Mikołajskie (zaledwie 0,2%), a najwyższy 21% w jeziorze Mamry (Rys. 28).



Rysunek 28. Udział procentowy komórek posiadających geny *mcy* w ogólnej liczebności *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp. w badanych jeziorach. Wyniki uśrednione ze wszystkich badanych próbek z danego jeziora w 2012 i 2013 roku.

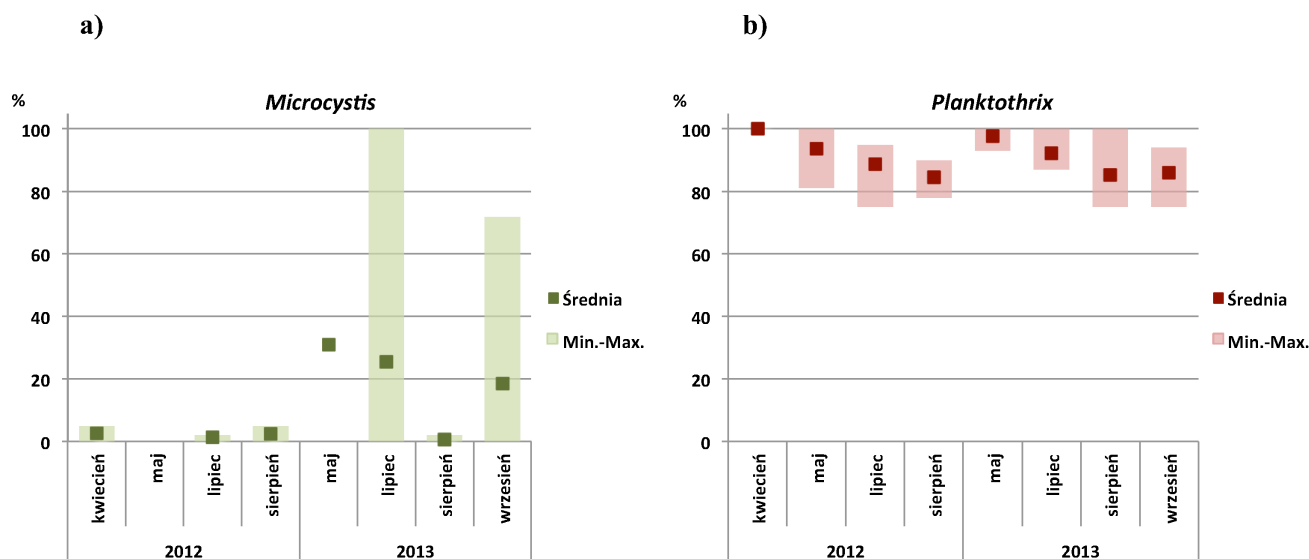
Analiza statystyczna testem U Mann-Whitney’a nie wykazała istotnych statystycznie różnic w udziale potencjalnie toksycznych komórek *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp. w dwóch latach badawczych (2012 i 2013). Analizy statystyczne (test Kruskal-Wallis’a oraz test U Mann-Whitney’a) nie wykazały także istotnych różnic między udziałem procentowym toksycznych genotypów *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp. w poszczególnych jeziorach. Te same analizy nie wykazały również różnic pomiędzy wyszczególnionymi na podstawie parametrów środowiskowych grupami jezior: Północną, Środkową i Południową.

Sprawdzano także, czy udział komórek toksycznych w ogólnej liczbie komórek dwóch badanych taksonów zmieniał się w czasie sezonu (Rys. 29). W przypadku *Microcystis* spp. nie zaobserwowano żadnej tendencji z jaką zmieniałby się udział komórek potencjalnie toksycznych. W roku 2012 komórki posiadające geny *mcy* stanowiły niewielki procent całej populacji *Microcystis* spp. – od 1% w lipcu do 3% w kwietniu średnio we wszystkich badanych próbkach (w maju nie zaobserwowano w ogóle obecności *Microcystis* spp.). W 2013 r. udział komórek potencjalnie toksycznych wykazywał dużą zmienność w kolejnych miesiącach – najniższy średni udział toksycznych komórek *Microcystis* spp. odnotowano w sierpniu (1%), najwyższy natomiast w maju (31%). Uśredniony udział komórek potencjalnie toksycznych w całkowitej liczebności *Microcystis* spp. w lipcu i wrześniu wynosił odpowiednio 26% i 19%, jednak w tych miesiącach zaobserwowano bardzo duże różnice pomiędzy poszczególnymi jeziorami. W lipcu procent komórek toksycznych w badanych jeziorach wahał się od 0 do 100%, natomiast we wrześniu było to od 0 do 72% (Rys. 29a). Analizy statystyczne również w tym przypadku nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy udziałem toksycznych genotypów *Microcystis* spp. w ogólnej liczbie komórek *Microcystis* spp. w poszczególnych miesiącach badawczych, a także w różnych porach roku (wiosna, lato, jesień).

W przypadku *Planktothrix* spp. w obydwu latach badań najwyższy udział procentowy komórek potencjalnie toksycznych występował na początku sezonu i nieznacznie spadał w kolejnych miesiącach. W roku 2012 najwyższy udział komórek toksycznych (średnio we wszystkich badanych jeziorach) notowano w kwietniu (100%), a najniższy w sierpniu (85%). Podobne wyniki zanotowano w kolejnym sezonie – 2013. Najwyższy procent komórki potencjalnie toksyczne stanowiły w maju (98%), najniższy zaś w sierpniu (85%) oraz wrześniu (86%). Analiza korelacji Spearman’a potwierdziła istotną statystycznie negatywną korelację pomiędzy udziałem procentowym komórek posiadających geny toksyczności w całkowitej liczebności *Planktothrix* spp. a okresem pobierania próbek do badań. Analiza wariancji testem Kruskal-Wallis’a wykazała również istotne statystycznie różnice między udziałem procentowym toksycznych genotypów w poszczególnych miesiącach ($H=10,53$, $p=0,0324$), oraz w poszczególnych porach roku ($H=8,60$, $p=0,0136$). Natomiast test U Mann-Whitney’a potwierdził różnice w udziale potencjalnie toksycznych komórek między wiosną i latem, oraz między wiosną i jesienią, nie wykazał natomiast różnicy między latem i jesienią.

Pomimo udowodnionego zmniejszania się udziału procentowego toksycznych genotypów *Planktothrix* spp. w czasie sezonu wegetacyjnego, we wszystkich badanych próbkach udział

komórek potencjalnie toksycznych był bardzo wysoki (nigdy nie spadał poniżej 75%), a zmienność pomiędzy jeziorami w danym miesiącu badań była niewielka i nigdy nie przekroczyła 25% (Rys. 29b).



Rysunek 29. Udział procentowy potencjalnie toksycznych komórek w całkowitej liczbie komórek a) *Microcystis* spp., b) *Planktothrix* spp. w latach 2012 i 2013. Zaznaczono średni udział w próbkach ze wszystkich badanych jezior w danym miesiącu (Średnia) oraz zakres zmienności między próbkami z badanych jezior w danym miesiącu (Min.-Max.).

5.5.4. Liczba komórek potencjalnie toksycznych a rzeczywiste stężenie mikrocytyn

W roku 2013 we wszystkich próbkach wody pobieranych z jezior do analiz qPCR mierzono również stężenie mikrocytyn rozpuszczonych w wodzie, a także całkowite stężenie mikrocytyn (rozpuszczonych w wodzie i zawartych w komórkach cyjanobakterii) (Tab. 18).

Stężenia mikrocytyn w wodzie były stosunkowo niewielkie. Najwyższe stężenie zanotowano w jeziorze Ryńskie w lipcu (0,6 µg/l). Natomiast całkowite stężenia mikrocytyn (w wodzie i w komórkach) były wyższe i osiągnęły maksymalnie 2,1 µg/l w jeziorze Mikołajskie we wrześniu (Tab. 18).

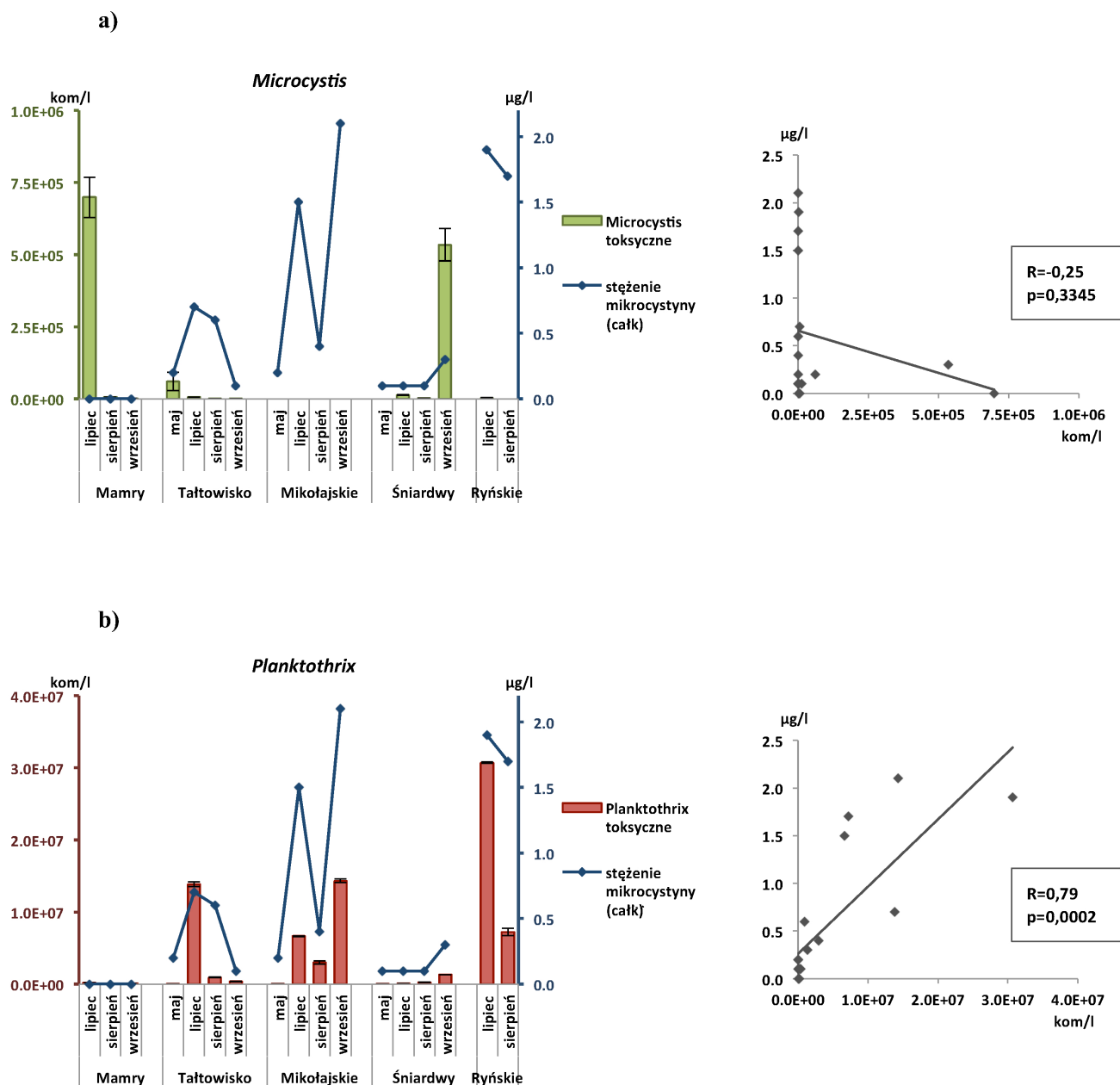
Całkowite stężenie mikrocytyn przekraczało 1 µg/l (czyli wg WHO (2003) graniczne stężenie bezpieczne dla wód wykorzystywanych jako woda pitna), gdy sumaryczna liczebność komórek *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp., posiadających geny *mcy* była

wyższa, niż $6,6 \times 10^6$ kom/l. Takie stężenie mikrocytyn zanotowano w czterech badanych próbkach, w trzech różnych miesiącach (Mikołajskie i Ryńskie w lipcu, Ryńskie w sierpniu, Mikołajskie we wrześniu) (Tab. 18).

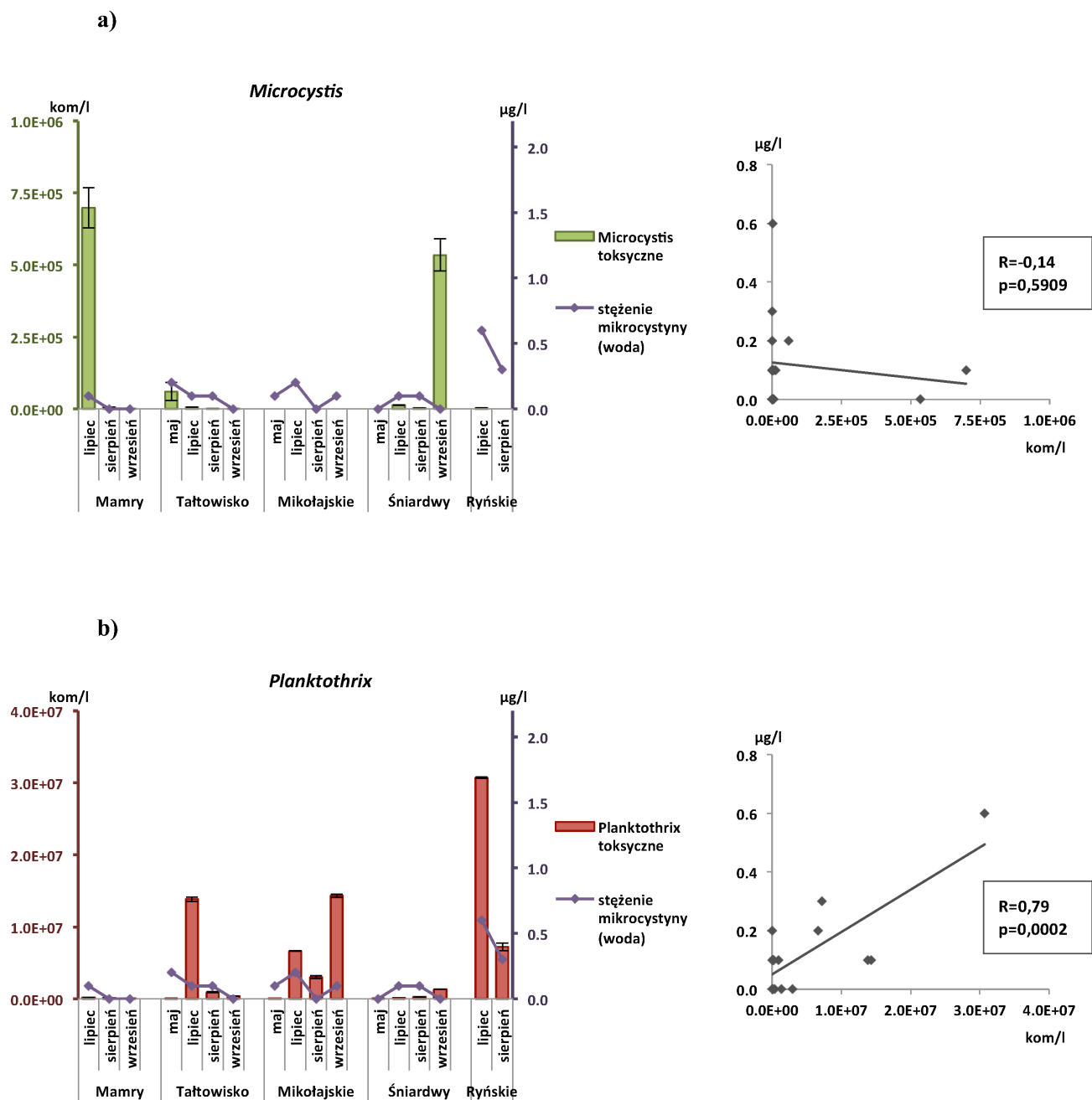
Tabela 18. Stężenie mikrocytyn rozpuszczonych w wodzie (woda) oraz sumaryczne stężenie mikrocytyn w wodzie i komórkach cyjanobakterii (całk), oznaczone metodą immunoenzymatyczną ELISA w próbkach wody jeziornej pobranych w 2013 roku.

Jezioro	maj		lipiec		sierpień		wrzesień	
	woda ($\mu\text{g/l}$)	całk ($\mu\text{g/l}$)	woda ($\mu\text{g/l}$)	całk ($\mu\text{g/l}$)	woda ($\mu\text{g/l}$)	całk ($\mu\text{g/l}$)	woda ($\mu\text{g/l}$)	całk ($\mu\text{g/l}$)
Mamry	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tałtowisko	0,2	bd	0,1	0,7	0,1	0,6	0,0	0,1
Mikołajskie	0,1	0,2	0,2	1,5	0,0	0,4	0,1	2,1
Śniardwy	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,3
Ryńskie	bd	bd	0,6	1,9	0,3	1,7	bd	bd

Analiza korelacji Spearman’a wykazała istotne statystycznie pozytywne korelacje pomiędzy liczbą komórek potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp. w badanych próbkach, a całkowitym stężeniem toksyn (Rys. 30b), a także stężeniem toksyn rozpuszczonych w wodzie (Rys. 31b). Nie stwierdzono za to podobnej korelacji pomiędzy liczebnością potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp. w próbkach, a stężeniem mikrocytyn (rozpuszczonych w wodzie i całkowitym) (Rys. 30a i 31a). Wyniki wskazują, że w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich wytwarzanie toksyn związane jest głównie z obecnością *Planktothrix* spp., tak więc to ten rodzaj cyjanobakterii wydaje się być głównym producentem mikrocytyn.



Rysunek 30. Zmiany liczebności komórek a) *Microcystis* spp., b) *Planktothrix* spp., posiadających geny *mcy*, oraz zmiany całkowitego stężenia mikrocystyn w próbkach (w wodzie i w komórkach), w pięciu badanych jeziorach w 2013 r. Po prawej wykresy regresji liniowej pomiędzy całkowitym stężeniem mikrocystyn a liczebnością potencjalnie toksycznych komórek.



Rysunek 31. Zmiany liczebności komórek a) *Microcystis* spp., b) *Planktothrix* spp., posiadających geny *mcy*, oraz zmiany stężenia mikrocystyn rozpuszczonych w wodzie, w pięciu badanych jeziorach w 2013 r. Po prawej wykresy regresji liniowej pomiędzy stężeniem rozpuszczonych mikrocystyn a liczebnością potencjalnie toksycznych komórek.

5.6. Bakteryjna degradacja mikrocystyn w wybranych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

W 2013 roku przeprowadzono badania, mające na celu stwierdzenie, czy w wodach i osadach dennych wybranych jezior systemu Wielkich Jezior Mazurskich występują bakterie posiadające zdolność do degradacji mikrocystyn. Jako genów markerowych używano genów z klastra *mlr* (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC* i *mlrD*), odpowiadających za degradację cyjanotoksyn. Sprawdzano też, czy istnieje związek między obecnością tych bakterii, a warunkami środowiskowymi, liczebnością cyjanobakterii oraz stężeniem mikrocystyn w jeziorze. Próbkę do badań pobierano z ośmiu opisywanych wcześniej jezior, oraz dwóch dodatkowych jezior, również należących do systemu Wielkich Jezior Mazurskich (Szymon i Ryńskie) – wiosną (maj), latem (lipiec) i jesienią (wrzesień).

Tabela 19. Obecność genów *mlr*, odpowiedzialnych za degradację mikrocystyn, w wodach i osadach dennych Wielkich Jezior Mazurskich w trzech miesiącach sezonu 2013.

Jezioro	maj		lipiec		wrzesień	
	osad	woda	osad	woda	osad	woda
Mamry	-	-	CD	-	CD	-
Kisajno	D	-	BCD	B	CD	-
Niegocin	BCD	-	BCD	AB	ACD	-
Szymon	ABCD	-	BCD	bd	ABCD	bd
Tałtowisko	ABCD	-	BCD	-	BCD	-
Ryńskie	bd	bd	BCD	A	bd	bd
Tały	BCD	-	CD	C	CD	-
Mikołajskie	-	-	BCD	B	BCD	-
Śniardwy	BCD	-	CD	B	CD	-
Beldany	C	-	CD	B	D	-

A – *mlrA*, B – *mlrB*, C – *mlrC*, D – *mlrD*, bd – brak danych

W Tabeli 19 przedstawiono obecność genów markerowych w wodach i osadach badanych jezior mazurskich. W osadach dennych, w każdym z badanych jezior potwierdzono obecność genów *mlr*, przynajmniej w jednym miesiącu sezonu badawczego. Jednak tylko w trzech próbkach (Szymon i Tałtowisko wiosną, oraz Szymon jesienią) znaleziono wszystkie 4 geny markerowe. We wszystkich próbkach pobieranych z osadów latem i jesienią, oraz w siedmiu próbkach pobieranych wiosną znajdowano geny klastra *mlr*, natomiast w dwóch próbkach

wiosennych (z jezior Mamry i Mikołajskie) nie potwierdzono obecności tych genów. Geny *mlr* znajdowano jedynie w próbkach wody pobieranych w lecie. W sześciu próbkach potwierdzono obecność przynajmniej jednego genu markerowego, w jednej próbce dwóch genów, w pozostałych dwóch próbkach nie znaleziono genów *mlr*.

Sprawdzano czy warunki środowiskowe, takie jak temperatura wody, głębokość, z której pobierane były próbki osadu, stężenie tlenu przy dnie, indeks stanu troficznego jeziora miały wpływ na obecność bakterii posiadających geny odpowiedzialne za degradację mikrocytyn (Tab. 20). W osadach dennych nie stwierdzono korelacji pomiędzy żadnym z badanych parametrów środowiskowych a obecnością genów *mlr*. Geny markerowe znajdowano w osadach, w jeziorach o różnych głębokościach (od 1,5 m do 28 m), zarówno w warunkach tlenowych, jak i mikroaerofilnych (definiowanych jako $< 3 \text{ mgO}_2/\text{l}$ w warstwie wody bezpośrednio nad osadem). Wartość indeksu stanu troficznego jeziora również nie miała wpływu na obecność lub brak genów klastra *mlr* w osadach.

W próbkach wody jeziornej nie stwierdzono również korelacji pomiędzy obecnością genów *mlr* a stanem troficznym jeziora. Geny markerowe wykrywano w jeziorach o średniej wartości TSI od 47,2 do 61,1, tj. w jeziorach o różnym stopniu eutrofizacji. Występowała natomiast pozytywna korelacja ($r^2=0,71$; $p \leq 0,05$) między temperaturą wody a obecnością genów *mlr*, co związane było z faktem, że geny te w próbkach wody wykrywano jedynie w lecie, kiedy woda była najcieplejsza.

W celu sprawdzenia, czy obecność bakterii degradujących jest związana bezpośrednio z obecnością toksyn, mierzono stężenie mikrocytyn przy pomocy testu immunoenzymatycznego ELISA, w wodzie oraz w osadach (Tab. 20). Stężenie mikrocytyn w wodzie z epilimnionu badanych jezior wynosiło 0-0,5 $\mu\text{g/l}$ w maju, 0,1-0,6 $\mu\text{g/l}$ w lipcu, najniższe stężenia 0-0,1 $\mu\text{g/l}$ wykrywano we wrześniu. W osadach natomiast najwyższe wykryte stężenie mikrocytyn wynosiło 0,1 $\mu\text{g/l}$. Obecność mikrocytyn w wodzie stwierdzono we wszystkich badanych próbkach pobranych w lipcu, oraz odpowiednio w sześciu i dwóch próbkach z maja i września. W osadach dennych wykrywano jedynie bardzo małe stężenia mikrocytyn (0,1 $\mu\text{g/l}$), w próbkach z trzech jezior pobieranych w lipcu, oraz w dwóch próbkach pobieranych w maju. Zarówno w przypadku wody, jak i osadów nie stwierdzono żadnej zależności pomiędzy obecnością genów odpowiadających za degradację mikrocytyn, a stężeniem mikrocytyn w próbce.

Sprawdzano także, czy obecność genów klastra *mlr* w wodzie jezior ma związek z liczebnością cyjanobakterii, czyli producentów mikrocystyn. Nie stwierdzono jednak korelacji między liczebnością sinic, a występowaniem genów degradacji toksyn.

Tabela 20. Charakterystyka warunków środowiskowych oraz stężenie mikrocystyn i liczebność cyjanobakterii w badanych jeziorach. Zaciemnienie oznacza obecność lub brak genów klastra *mlr* w próbce:

□ - brak *mlr* □ - *mlr* w osadzie ■ - *mlr* w osadzie i w wodzie

Jezioro		Temp.	Głębokość	TSI	Stężenie	Stężenie MC		Liczebność sinic
		wody pow.	osadów		tlenu przy dnie			
		(°C)	(m)	(chl _a , P, SD)	(mg/l)	(µg/l)		(kom/l)
						osad	woda	
maj	Mamry	13,4	16,5	48,3	13,5	0	0	1,5E+08
	Kisajno	13,1	15	50,2	13,0	0,1	0,1	bd
	Niegocin	13,8	9	59,9	13,9	0	0,3	bd
	Szymon	16,7	1,5	60,3	12,8	0	0,4	bd
	Taltowisko	14,7	28	60,6	8,3	0	0,2	7,8E+06
	Talty	11,2	27	64,0	9,5	0	0,5	bd
	Mikołajskie	14,2	22,5	63,3	9,2	0	0,1	2,9E+07
	Śniardwy	13,9	9	55,2	13,2	0,1	0	3,7E+07
	Beldany	14,5	21	59,2	6,2	0	0	1,1E+07
lipiec	Mamry	20,6	16,5	46,9	8,1	0	0,1	1,1E+08
	Kisajno	21,3	15	47,2	6,2	0	0,1	bd
	Niegocin	20,4	9	53,2	2,0	0	0,1	bd
	Szymon	21,0	1,5	52,9	10,1	0	0,1	bd
	Taltowisko	21,7	28	55,2	2,8	0	0,1	2,3E+08
	Ryńskie	21,4	26,5	61,1	0,1	0,1	0,6	bd
	Talty	21,9	27	59,5	4,0	0,1	0,1	bd
	Mikołajskie	19,9	22,5	58,8	0,3	0,1	0,2	1,4E+08
	Śniardwy	20,2	9	54,9	9,3	0	0,1	1,0E+07
	Beldany	20,6	21	57,9	0,2	0	0,2	8,5E+07
wrzesień	Mamry	bd	16,5	54,0	bd	0	0	2,7E+08
	Kisajno	bd	15	49,2	bd	0	0	bd
	Niegocin	bd	9	56,6	bd	0	0	bd
	Szymon	bd	1,5	56,9	bd	0	0	bd
	Taltowisko	bd	28	53,0	bd	0	0	2,8E+08
	Talty	bd	27	57,3	bd	0	0,1	bd
	Mikołajskie	17,0	22,5	60,5	bd	0	0,1	5,8E+08
	Śniardwy	bd	9	59,2	bd	0	0	2,2E+08
	Beldany	bd	21	58,8	bd	0	0	3,3E+08

TSI – indeks stanu troficznego Carlsona (średni, obliczony ze stężeń chlorofilu_a, fosforu całkowitego i widzialności krążka Secchi’ego), MC – mikrocystyny, bd – brak danych.

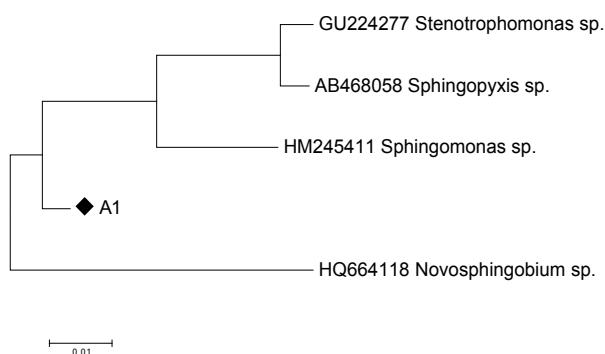
W celu identyfikacji taksonów bakterii degradujących mikrocyстыny w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich, przeprowadzono sekwencjonowanie wszystkich czterech zamplifikowanych wcześniej genów *mlr* z kilku wybranych próbek zarówno wody jak i osadów dennych. Udało się uzyskać jedną sekwencję genu *mlrA*, po cztery sekwencje genów *mlrB* i *mlrC* oraz trzy sekwencje genu *mlrD* (Tab. 21). Sekwencje znajdują się w Załączniku 5.

Tabela 21. Sekwencje *mlr* otrzymane z próbek wody i osadów dennych Jezior Mazurskich, oraz najbardziej podobne sekwencje z bazy GenBank.

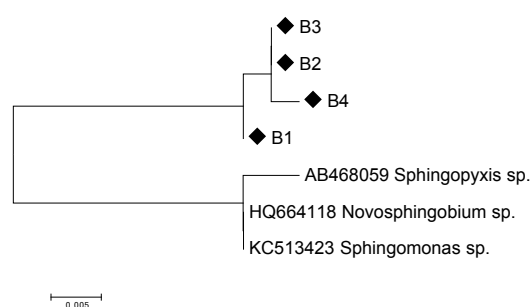
Sekwencja	Jezioro i czas izolacji		Najbardziej podobne sekwencje w bazie GenBank	Podobieństwo sekwencji (%)
	osad	woda		
<i>mlrA</i>	A1	Tałtowisko maj	<i>Sphingomonas</i> sp. HM245411	96
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. GU224277	96
			<i>Sphingopyxis</i> sp. AB468058	95
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	94
<i>mlrB</i>	B1	Tałtowisko maj	<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	96
			<i>Sphingomonas</i> sp. KC513423	95
			<i>Sphingopyxis</i> sp. AB468059	94
	B2	Tałtowisko lipiec	<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	96
			<i>Sphingomonas</i> sp. KC513423	95
			<i>Sphingopyxis</i> sp. AB468059	94
	B3	Tałtowisko wrzesień	<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	96
			<i>Sphingomonas</i> sp. KC513423	95
			<i>Sphingopyxis</i> sp. AB468059	94
	B4	Mikołajskie lipiec	<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	93
			<i>Sphingomonas</i> sp. KC513423	93
			<i>Sphingopyxis</i> sp. AB468059	92
<i>mlrC</i>	C1	Tałtowisko maj	<i>Sphingomonas</i> sp. KC573527	87
			<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423531	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	87
	C2	Tałtowisko lipiec	<i>Sphingomonas</i> sp. AF411070	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	87
			<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423531	86
	C3	Tałtowisko wrzesień	<i>Sphingomonas</i> sp. AF411070	88
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	88
			<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423531	87
	C4	Tałty lipiec	<i>Sphingomonas</i> sp. KC573527	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	87
			<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423531	87
<i>mlrD</i>	D1	Tałtowisko maj	<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423532	94
			<i>Sphingomonas</i> sp. JN256927	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	86
	D2	Tałtowisko lipiec	<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423532	93
			<i>Sphingomonas</i> sp. JN256927	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	96
	D3	Tałtowisko wrzesień	<i>Sphingopyxis</i> sp. DQ423532	93
			<i>Sphingomonas</i> sp. JN256927	87
			<i>Novosphingobium</i> sp. HQ664118	86

Otrzymane sekwencje porównywano z bazą danych GenBank przy pomocy programu BLAST (Tab. 21). Stworzono również drzewa filogenetyczne na podstawie uzyskanych sekwencji oraz sekwencji taksonów opisywanych wcześniej jako zdolne do degradacji mikrocytyn (Rys. 32).

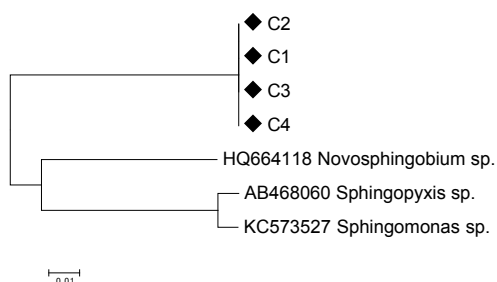
a) *mlrA*



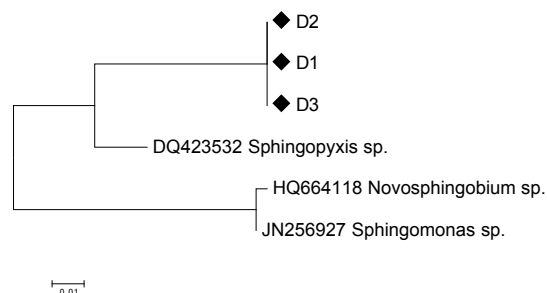
b) *mlrB*



c) *mlrC*



d) *mlrD*



Rysunek 32. Drzewa filogenetyczne otrzymane metodą największej wiarygodności (ang. maximum likelihood), model GTR, stworzone na podstawie sekwencji genów *mlr* z badanych jezior systemu Wielkich Jezior Mazurskich i sekwencji z bazy GenBank: *Sphingomonas* sp. (HM245411, KC513423, KC573527, JN256927), *Sphingopyxis* sp. (AB468058, AB468059, AB468060, DQ423532), *Novosphingobium* sp. (HQ664118) i *Stenotrophomonas* sp. (GU224277).

♦ - sekwencje z Wielkich Jezior Mazurskich, opis znajduje się w Tabeli 21.

Wszystkie otrzymane sekwencje czterech genów klastra *mlr* wykazywały podobieństwo do różnych taksonów bakterii z rodziny *Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*), które wcześniej były opisywane, jako posiadające zdolność degradacji mikrocystyn. Dodatkowo, w przypadku genu *mlrA*, sekwencja z jezior mazurskich wykazywała podobieństwo (96%) do genu *mlrA* szczepu *Stenotrophomonas* sp., należącego do *Gammaproteobacteria*, u którego również stwierdzono zdolność degradacji mikrocystyn. Podobieństwo do innych sekwencji klastra *mlr* opublikowanych w bazie GenBank wynosiło 94-96% dla *mlrA*, oraz odpowiednio 92-96% dla *mlrB*, 86-88% dla *mlrC*, oraz 86-94% dla *mlrD*. Natomiast sekwencje z badanych jezior mazurskich były między sobą podobne w zakresie 97-99% *mlrB*, 99-100% *mlrC* i 99% *mlrD*.

Na podstawie uzyskanych wyników, a także z powodu niewielkiej liczby sekwencji genów klastra *mlr* w bazach danych, nie można sekwencji z jezior mazurskich przypisać do konkretnego taksonu, jednak z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że należą one do bakterii z rodziny *Sphingomonadaceae*.

6. Dyskusja

6.1. Cyjanobakterie

6.1.1. Badane środowiska występowania cyjanobakterii

Osiem analizowanych pod kątem obecności i różnorodności cyjanobakterii jezior różni się wieloma parametrami biologicznymi i fizyko-chemicznymi. Postanowiono więc najpierw pogrupować je za pomocą statystycznych metod aglomeracyjnych, aby wyróżnić jeziora najbardziej do siebie zbliżone. W analizach tych brano pod uwagę czynniki środowiskowe, które w istotny sposób mogą wpływać na zespoły cyjanobakterii. Taka klasyfikacja pozwoliła na łatwiejsze obrazowanie zależności pomiędzy zespołami sinic w badanych jeziorach.

Analiza aglomeracyjna wyróżniła istnienie trzech grup spośród badanych jezior. Grupy te w dużym stopniu pokrywały się z położeniem geograficznym jezior w systemie Wielkich Jezior Mazurskich, dlatego też na użytek niniejszej pracy, stworzone grupy nazwano Północną, Środkową i Południową (Rys. 12). Do grupy Północnej zaliczono jeziora Mamry i Kisajno, do Środkowej - Niegocin, Tałtowisko i Tałty, a do Południowej - Mikołajskie, Beldany i Śniardwy. Odrębność jezior grupy Północnej była zjawiskiem spodziewanym. Jeziora Mamry i Kisajno leżą poniżej działu wodnego całego systemu, w dorzeczu Pregoly, w odróżnieniu od jezior grupy Środkowej i Południowej, położonych w dorzeczu Wisły. Oznacza to, że ich wody nie mieszają się z pozostałymi jeziorami grupy Środkowej i Południowej. Dotychczasowe badania (Chróst i Siuda 2006, Siuda 2008) pokazują też, że jeziora północnej części systemu są najmniej zeutrofizowane. Grupę Środkową stanowią jeziora w środkowej części systemu WJM. Nie są one połączone bezpośrednio, ale poprzez kanały. Przepływ wody w tej części Wielkich Jezior Mazurskich przebiega od jeziora Niegocin w stronę jezior położonych w części południowej. Tak więc za podobieństwo parametrów w jeziorach wyróżnionej grupy Środkowej odpowiada zapewne bliskość geograficzna, a także przepływ wody przez kolejne jeziora tej grupy. Interesujące jest, że jezioro Tałty pod względem podobieństwa czynników środowiskowych zaliczono do grupy Środkowej, mimo, iż jest ono bezpośrednio połączone z jeziorem Mikołajskim, z którym wspólnie z kolejnymi jeziorami tworzą długi kompleks jezior rynnowych ciągnący się w kierunku południowym. Ostatnia wyróżniona grupa w analizie aglomeracyjnej to Południowa,

która również charakteryzuje się bliskością geograficzną jezior, oraz ich bezpośrednim połączeniem ze sobą. W jeziorach tych parametry fizykochemiczne i biologiczne wody były do siebie zbliżone, mimo dużych różnic w morfometrii jezior. Mikołajskie i Bełdany to głębokie jeziora rynnowe, podczas gdy Śniardwy to jezioro morenowe, o bardzo dużej powierzchni, ale niewielkiej średniej głębokości. Ciekawy jest fakt, że pomimo grupowania się jezior w dużej mierze w sposób odpowiadający położeniu geograficznemu, największe podobieństwo między wyróżnionymi grupami istniało dla grup Północnej i Południowej, natomiast grupa Środkowa bardziej różniła się od dwóch pozostałych (Rys. 12a).

Parametry biologiczne brane pod uwagę w analizie aglomeracyjnej grupującej badane jeziora wpływają na status troficzny, tak więc oczywiste jest, że wyodrębnione grupy będą różniły się także indeksem stanu troficznego (TSI). Jeziora grupy Północnej wykazywały się najniższą trofią, zaś najwyższe wartości TSI notowano w jeziorach Południowych, co jest zgodne z wcześniej publikowanymi wynikami badań (Chróst i Siuda 2006).

6.1.2. Identyfikacja taksonomiczna cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

Metody biologii molekularnej coraz częściej zastępują dotychczas stosowane metody badań mikroorganizmów w środowiskach naturalnych. Ich zaletą jest zwykle mniejsza pracochłonność, która skutkuje znacznie szybszym uzyskaniem poszukiwanej informacji, czułość i duża ilość uzyskiwanych danych. Najpopularniejsze metody oznaczania składu taksonomicznego fitoplanktonu, w tym cyjanobakterii, opierają się na badaniach mikroskopowych, np. metoda Utermöhl. Pozwala ona oznaczać cyjanobakterie z dużą precyzją, do poziomu gatunku. Wymaga jednak bardzo dużego nakładu pracy oraz ogromnego doświadczenia badacza, ponieważ istnieje wiele podobnych taksonów, które łatwo ze sobą pomylić. W celu identyfikacji taksonomicznej sinic występujących w badanych jeziorach systemu WJM, postanowiono więc zastosować metodę rozdziału amplifikowanego fragmentu ITS na żelu z gradientem denaturującym (DGGE), a następnie sekwencjonowanie DNA z wyciętych z żelu i reamplifikowanych prążków. Przeprowadzono analizę porównawczą klasycznej metody mikroskopowej, oraz metody opartej na DGGE-ITS, aby sprawdzić w jakim stopniu ich wyniki będą się pokrywały i czy metoda molekularna jest w stanie zastąpić badania mikroskopowe. Porównywano wyniki analiz dla próbek pobranych z czterech różnych jezior, w czterech miesiącach roku 2011, razem dla 12 różnych próbek.

W obydwu porównywanych analizach, we wszystkich badanych próbkach łącznie znaleziono taką samą liczbę taksonów – 44. Jednak poszczególne badane próbki różniły się między sobą, średnio analizy molekularne pozwalały na wykrycie mniejszej liczby taksonów, niż badania mikroskopowe (średnio o ok. 3 taksony mniej). Niewątpliwą przewagą metody mikroskopowej jest możliwość klasyfikacji badanych mikroorganizmów do poziomu gatunku, w przypadku próbek z jezior mazurskich udało się to dla 89% zidentyfikowanych taksonów, pozostałe natomiast oznaczono do rodzaju. Natomiast w analizie DGGE-ITS większość uzyskanych sekwencji klasyfikowano do poziomu rodzaju, a niektóre tylko do rodziny lub rzędu.

Niemożliwość identyfikacji konkretnego gatunku na podstawie uzyskanych sekwencji może wynikać z kilku faktów. Przede wszystkim, mimo coraz większej liczby sekwencji różnych gatunków deponowanych w bazach danych, nadal brak jest sekwencji niektórych taksonów. Taka sytuacja występuje w przypadku wielu gatunków sinic, na przykład w bazie GenBank nie zdeponowano sekwencji ITS cyjanobakterii z rodzajów *Lemmermanniella* czy *Rhabdoderma*, których występowanie zostało ujawnione w analizach mikroskopowych próbek wody z badanych jezior systemu WJM.

Dla wielu sekwencji, zwłaszcza środowiskowych, umieszczonych w bazach danych, nie jest też opisany konkretny gatunek lub szczep z którego dana sekwencja pochodzi. Ponieważ identyfikacja taksonomiczna z użyciem sekwencji DNA opiera się na badaniach porównawczych z innymi znanymi sekwencjami, brak podobnych i dobrze opisanych sekwencji referencyjnych prowadzi do niemożności klasyfikacji taksonomicznej nowo otrzymywanych sekwencji.

Mniejsza liczba taksonów identyfikowanych metodą molekularną może wynikać z faktu, że bardzo trudno jest dobrać startery do amplifikacji danego fragmentu DNA, które byłyby specyficzne dla bardzo szerokiej grupy gatunków i jednocześnie nie amplifikowałyby niepożądanych produktów z obcego DNA. Startery używane w metodzie DGGE-ITS, zaprojektowane przez Janse i wsp. 2003, były dotychczas używane w dużej liczbie opublikowanych badań (np. Kardinaal i wsp. 2007, van Gremberghe i wsp. 2009, Yen i wsp. 2012, Luo i wsp. 2014, Taşkan 2016) i sprawdzono, że są specyficzne dla większości taksonów cyjanobakterii. Wiadomo jednak, że mogą amplifikować z mniejszą wydajnością sekwencje z rodzajów *Limnothrix* i *Pseudanabaena*, ponieważ istnieje niezgodność jednego nukleotydu w obszarze przyłączania końca 3' startera F, a zgodność sekwencji na tym końcu jest kluczowa dla powodzenia reakcji amplifikacji (Rychlik 1995). *Limnothrix*

i *Pseudanabaena* spp. są rodzajami powszechnie występującymi w jeziorach mazurskich i były wykrywane w badaniach mikroskopowych, rzeczywiście jednak nie zidentyfikowano ich sekwencji za pomocą metody DGGE-ITS. Innym problemem w identyfikacji taksonomicznej sinic na podstawie sekwencji ITS jest fakt, że uzyskane sekwencje mogą być równie podobne do dwóch lub kilku różnych taksonów. Kolejnym ograniczeniem obydwu metod identyfikacji taksonomicznej jest niewątpliwie niemożność oznaczenia taksonów występujących w bardzo małych liczebnościach. Przewagą metody molekularnej jest większa objętość próbki wody użytej do izolacji DNA (250 ml), przy 25 lub 50 ml próbki do badań mikroskopowych. Większa objętość próbki wody skutkuje możliwością „wyłapania” większej ilości taksonów rzadko występujących lub obecnych w niewielkiej ilości komórek. Jednak należy też pamiętać, że w metodach molekularnych z użyciem próbek środowiskowych wydajność amplifikacji DNA jest czasem zmniejszona poprzez obecność inhibitorów takich jak np. kwasy humusowe. Metoda DGGE również nie pozwala na uzyskanie sekwencji z wszystkich prążków otrzymanych na żelu poliakrylamidowym – niektóre z nich są zbyt słabo widoczne, lub położone zbyt blisko siebie i ich wyodrębnienie, i późniejsze sekwencjonowanie jest utrudnione. Może to więc oznaczać, że pomimo potencjalnie większej czułości metod molekularnych, dokładniejsze wyniki odnośnie przynależności taksonomicznej cyjanobakterii można uzyskać stosując klasyczną metodę obserwacji mikroskopowych.

Porównano czułość obydwu opisywanych metod na przykładzie dwóch różnych taksonów cyjanobakterii – rodzaju *Microcystis* o kokoidalnym kształcie komórek, oraz nitkowatego rodzaju *Planktothrix*. Metoda mikroskopowa Utermöhla pozwoliła na identyfikację obecności *Microcystis* spp. w zagęszczeniach niższych od 1 kom/ml, metoda DGGE-ITS natomiast pozwalała na wykazanie obecności *Microcystis* spp. w próbkach, w których liczebność komórek wynosiła powyżej 30 kom/ml. Zdecydowanie czulszą analizą okazała się więc klasyczna metoda mikroskopowa. Nie otrzymano natomiast tak jednoznacznych wyników dla drugiego badanego taksonu – *Planktothrix* spp. Przy dużych zagęszczeniach komórek, powyżej kilkuset kom/ml, takson ten był wykrywalny w badanych próbkach wody przez obydwie metody. Natomiast gdy liczebność *Planktothrix* spp. była niska (np. w maju), w niektórych próbkach można było wykazać obecność tego taksonu tylko metodą mikroskopową, lub tylko metodą molekularną. W przypadku *Planktothrix* spp. nie możemy więc stwierdzić, która metoda jest bardziej czuła. Najprawdopodobniej zależy to od różnych czynników, takich jak np. wydajność izolacji DNA czy skuteczność sedimentacji próbki w

badaniach mikroskopowych.

Analiza porównawcza dwóch metod identyfikacji taksonomicznej cyjanobakterii wykazała, że dla pełnego poznania struktury taksonomicznej niezbędne są nadal metody mikroskopowe. Pozwalają one na identyfikację większej liczby taksonów z większą dokładnością. Analiza oparta na metodzie DGGE i fragmencie ITS umożliwia mniej dokładne rozpoznanie struktury cyjanobakterii w zbiorniku wodnym, głównie do rodzaju lub rodziny, jednak jej zaletą jest zdecydowanie większa szybkość oraz brak konieczności prowadzenia analizy przez osobę bardzo doświadczoną w identyfikacji taksonów. Nie mniej, w przypadku kiedy zachodzi potrzeba szybkiej „zgrubej identyfikacji” nieznanymi cyjanobakterii w licznych próbkach, metody molekularne mogą być z powodzeniem stosowane. Skupiając się na wycięciu i sekwencjonowaniu tylko najlepiej widocznych na żelu prążków, można uzyskać informacje o taksonach dominujących w danej próbce, co może być niezwykle cenną wiedzą w przypadku próbek z wód wykorzystywanych w rekreacji czy jako woda pitna. Oczywiście istnieją metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS), które w jeszcze szybszy sposób pozwoliłyby na zsekwencjonowanie badanych fragmentów DNA w próbce, bez konieczności ich wcześniejszego rozdzielania w elektroforezie. Metody te są jednak jeszcze obecnie zbyt kosztowne w przypadku wielu, zwłaszcza rutynowych zastosowań, np. monitoringu wód, a problem niewystarczającej liczby sekwencji referencyjnych w bazach danych istnieje również w tym przypadku.

6.1.3 Zmienność zespołów cyjanobakterii w czasie i przestrzeni

Analiza DGGE-ITS pozwala nie tylko na rozdzielenie fragmentów DNA w celu ich późniejszego sekwencjonowania, ale przede wszystkim na stworzenie profili prążkowych, charakterystycznych dla danej próbki. Taki unikalny wzór (ang. fingerprint) jest odzwierciedleniem badanego zespołu cyjanobakterii (Muyzer i wsp. 1993). Porównywanie profili prążkowych z różnych próbek umożliwia na przykład prześledzenie zmian w danym zespole w czasie, lub porównanie zespołów sinic z różnych jezior.

Analizę DGGE-ITS przeprowadzono dla próbek pobranych w latach 2011 i 2012 z ośmiu jezior mazurskich w różnym okresie sezonu wegetacyjnego (od kwietnia do września). Ilość OTU w poszczególnych ścieżkach na żelu, odpowiadających poszczególnym próbkom pozwoliła obliczyć bogactwo taksonomiczne cyjanobakterii. Uzyskane wyniki pokazują, że w badanych jeziorach współzystuje bardzo duża liczba różnych taksonów sinic, co pokazały

również badania mikroskopowe opisywane w rozdziale 4.2.1. W próbie o najwyższym bogactwie taksonomicznym odkryto aż 27 prążków (OTU), odpowiadających różnym taksonom. Średnia liczba taksonów sinic w jeziorach mazurskich była największa w lipcu (20), zaś w kolejnych miesiącach – sierpniu i wrześniu, tylko nieznacznie spadała (18 i 19). W porównaniu z miesiącami letnimi, wiosną bogactwo taksonomiczne było znacznie mniejsze – średnio 12 i 8 taksonów odpowiednio w kwietniu i maju. Otrzymane wyniki są zgodne z dotychczasową wiedzą na temat sukcesji zespołów cyjanobakterii w czasie sezonu wegetacyjnego w jeziorach klimatu umiarkowanego. Największa biomasa sinic występuje latem, po “fazie czystej wody”, kiedy woda jest najcieplejsza i występuje największe nasłonecznienie (Wetzel 2001). Wyniki DGGE wskazują, że w jeziorach mazurskich w miesiącach letnich nie tylko biomasa jest najwyższa, ale także struktura taksonomiczna sinic jest wtedy najbardziej zróżnicowana. Rzeczywiście obserwacje ostatnich lat pokazują, że mimo zdecydowanej dominacji cyjanobakterii w fitoplanktonie jezior systemu WJM, w badanych jeziorach rzadko występowały masowe jednogatunkowe zakwity (Napiórkowska-Krzebietke i Hutorowicz 2006, Bukowska i wsp. 2014a, Napiórkowska-Krzebietke 2015).

Analizy porównawcze zespołów cyjanobakterii w czasie sezonu oraz między jeziorami mogą dostarczyć także informacji o najważniejszych czynnikach środowiskowych potencjalnie kształtujących zmienność taksonomiczną. W systemie Wielkich Jezior Mazurskich jest to szczególnie ważne, ponieważ wszystkie jeziora są ze sobą połączone, poszczególne taksony mogłyby więc w sprzyjających okolicznościach łatwo się rozprzestrzeniać. Analiza korelacji Spearman’a wykazała, że brak jest zależności pomiędzy liczbą taksonów sinic w badanych jeziorach a ich aktualnym stanem troficznym. Pomimo, iż wiadomo, że wyższy stan troficzny wód sprzyja występowaniu cyjanobakterii (Pizzolon 1999, Dokulil i Teubner 2000), w przypadku jezior mazurskich, w również w jeziorach o najniższym statusie troficznym analizy w niektórych próbkach wody ujawniały bardzo dużą liczbę taksonów. Przykładowo w jeziorze Mamry w sierpniu 2011 r. znaleziono w profilu DGGE 24 prążki, odpowiadające 24 różnym taksonom (średnia wartość dla wszystkich próbek to 16 OTU). W jeziorach o niskiej trofii zwykle skład gatunkowy sinic jest inny, aniżeli w wodach bardziej zeutrofizowanych, jednak stosunkowo wysoka różnorodność taksonomiczna stwarza niebezpieczeństwo wystąpienia zakwitu w warunkach środowiska stymulujących rozwój któregoś z taksonów. Przy dużej różnorodności taksonomicznej cyjanobakterii w jeziorze zwiększa się także szansa na występowanie gatunków toksycznych.

Analiza klastrowa, stworzona na podstawie obecności lub braku danego prążka w profilu prążkowym danej próbki, wykazała, że położenie geograficzne czy nawet bezpośrednie połączenie między jeziorami nie są czynnikami, które w dużym stopniu wpływają na podobieństwo zespołów cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu WJM. Kluczowym za to okazał się okres, w którym pobierano próbki. Największe podobieństwo obserwowano między zbiorowiskami sinic w poszczególnych porach roku, co obrazuje dendrogram przedstawiony na rysunku 19. Mimo dużych różnic, zarówno w statusie troficznym, jak i w morfometrii badanych jezior, najważniejszy dla struktury zespołów cyjanobakterii okazał się zewnętrzny czynnik. Poszczególne pory roku charakteryzują się innymi warunkami pogodowymi, takimi jak temperatura, nasłonecznienie czy suma opadów, a ponieważ wszystkie badane jeziora położone są w tym samym regionie, opisywane czynniki działają na nie w podobny sposób. Tak duże znaczenie czynników zewnętrznych w kształtowaniu się zespołów cyjanobakterii zwraca uwagę na niebezpieczeństwo związane ze zmianami klimatycznymi. Ocieplanie się klimatu zwiększa zagrożenie masowego pojawiania się sinic, ponieważ wydłużeniu ulega okres, w którym panują warunki optymalne dla ich rozwoju (Paerl i Huisman 2008). Otrzymane wyniki zaś ujawniają, że zmiany klimatyczne w równym stopniu mogą wpływać zarówno na jeziora mocno zeutrofizowane, w których zwykle można spodziewać się dużych liczebności cyjanobakterii, ale też na jeziora o niskim statusie troficznym, które wydawałyby się niezagrożone zakwitami sinic.

Analiza wzorów występowania poszczególnych OTU pokazuje, że połowa z całkowitej liczby ujawnionych taksonów w badanych jeziorach systemu WJM, występuje we wszystkich badanych jeziorach, biorąc zaś pod uwagę grupy jezior stworzone na podstawie czynników środowiskowych, 84% taksonów znajdowano we wszystkich trzech grupach – Północnej, Środkowej i Południowej. Natomiast biorąc pod uwagę podział na dwa lata badawcze, 95% OTU wystąpiło w obydwu sezonach. Widoczne jest więc, że w większości jezior istnieje podobny potencjał występowania poszczególnych taksonów, a ich aktualna biomasa zależna jest od panujących warunków środowiskowych. Przystosowania występujących w jeziorach taksonów do warunków zewnętrznych, głównie zmian klimatycznych i meteorologicznych, pokazuje liczba OTU wspólnych i unikalnych dla poszczególnych pór roku (Rys 20). Pomimo, że większość taksonów (66%) obecna była przez cały sezon wegetacyjny, odkryto też takie, które występowały w jeziorach mazurskich tylko latem, a także takie, które były obecne wiosną i latem, ale nie jesienią, oraz obecne latem i jesienią, ale nie występujące wiosną. Istnienie znaczącej grupy taksonów podatnej na czynniki klimatyczne wskazuje na

duże znaczenie zewnętrznych warunków środowiskowych na kształtowanie się zbiorowisk mazurskich cyjanobakterii.

6.1.4. Identyfikacja taksonomiczna toksycznych cyjanobakterii w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

Niezależnie od stosowanej metodyki analityczno-badawczej, poznanie struktury taksonomicznej zespołów cyjanobakterii w zbiorniku wodnym nie umożliwia stwierdzenia, które z obecnych taksonów mogą wytwarzać toksyczne mikrocyistyny. W obrębie jednego gatunku mogą istnieć zarówno toksyczne, jak i nietoksyczne szczepy (Chorus i Bartram 1999). Mogą one też współzysztować w jednym zbiorniku wodnym, a rozróżnienie ich za pomocą metod mikroskopowych nie jest możliwe. W bardzo zróżnicowanych zespołach cyjanobakterii w jeziorach mazurskich występuje wiele potencjalnie toksycznych gatunków. Wiadomo, że mikrocyistyny mogą być wytwarzane przez niektóre szczepy z rodzajów *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Dolichospermum*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Pseudanabaena* czy *Synechococcus* (Cox i wsp. 2005, Paerl i Huisman 2009, Boopathi i Ki 2014, Jasser i Callieri 2017). Bardzo ważne jest więc stwierdzenie, które taksony sinic w badanych jeziorach rzeczywiście mogą produkować mikrocyistyny, a więc posiadają geny odpowiedzialne za ten proces.

W niniejszej pracy zaproponowano procedurę rozpoznania toksycznych rodzajów cyjanobakterii w próbkach środowiskowych z zastosowaniem analizy DGGE, w której użyto fragment genu *mcyA* z klastra kodującego enzymy syntetyzujące mikrocyistyny (Bukowska i wsp. 2014a). Mieszanina zamplifikowanych fragmentów *mcyA* z różnych taksonów jest rozdzielana na żelu poliakrylamidowym, a następnie pojedyncze prążki są wycinane z żelu, sekwencjonowane i porównywane z innymi sekwencjami w celu klasyfikacji taksonomicznej. Startery używane do amplifikacji tego fragmentu zostały zaprojektowane przez Hisbergues i wsp. (2003), tak, aby były specyficzne dla wielu rodzajów cyjanobakterii mogących produkować mikrocyistyny, m. in. *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Planktothrix* i *Nostoc*. Inni autorzy używali tych starterów do amplifikacji fragmentu *mcyA* również z *Leptolyngbya* sp. (Richardson i wsp. 2007) i *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fathalli i wsp. 2011). Ponieważ jednak w większości przypadków ich testy były przeprowadzane na DNA izolowanym z czystych szczepów cyjanobakterii, nie jest potwierdzone, czy mogą bez przeszkód amplifikować DNA ze wszystkich tych taksonów w próbkach środowiskowych (Bukowska

i wsp. *in press*). Należy też zaznaczyć, że rozpoznanie toksycznych cyjanobakterii może być niepełne ze względu na brak sekwencji referencyjnych klastra *mcy* z niektórych taksonów w dostępnych bazach danych. Obecnie w bazie GenBank znajdują się sekwencje genu *mcyA* z rodzajów takich jak: *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Mastigocladus*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Radiocystis*.

Wyniki analizy DGGE-*mcyA* z próbek z ośmiu badanych jezior mazurskich wskazują, że pomimo bardzo dużego zróżnicowania struktury cyjanobakterii w systemie WJM, jedynie dwa rodzaje z nich - *Microcystis* i *Planktothrix* mogą wytwarzać mikrocystyny. Gatunki *Planktothrix agardhii* i *Microcystis aeruginosa* są najczęściej występującymi producentami mikrocystyn w ekosystemach słodkowodnych (Fastner i wsp. 1999b). Zakwity *Microcystis* spp. są powszechnym zjawiskiem w eutroficznych ekosystemach wodnych na całym świecie (Carmichael 1996, Oh i wsp. 2012). *Planktothrix* spp. natomiast często dominuje w strukturze taksonomicznej cyjanobakterii w niezbyt głębokich, eutroficznych jeziorach (Jacquet i wsp. 2005, Kurmayer i wsp. 2011), może jednak występować też w znaczących liczebnościach w głębokich jeziorach mezo-eutroficznych i eutroficznych (Napiórkowska-Krzebietke i wsp. 2007).

6.1.5. Zmienność populacji toksycznych cyjanobakterii w czasie i przestrzeni

Gen *mcyA* znajdowano we wszystkich badanych jeziorach mazurskich. Oznacza to, że każde z badanych jezior jest narażone na wystąpienie toksycznego zakwitu. Gen toksyczności charakterystyczny dla *Microcystis* spp. wykrywano rzadziej, niż sekwencja *Planktothrix* spp. Nitkowaty rodzaj *Planktothrix* zwykle występuje w wodach o wyższym statusie troficznym, czyli w takich warunkach, jakie panują w jeziorach grupy Środkowej i Południowej. Rzeczywiście w tych jeziorach dominują toksyczne *Planktothrix* spp., natomiast toksyczne szczepy *Microcystis* spp. były w nich znajdowane jedynie sporadycznie. Jeziora północnej części systemu Wielkich Jezior Mazurskich charakteryzują się niższym statusem troficznym. Niższa trofia chroni tę grupę jezior przed masowym pojawianiem się sinic nitkowatych. Wyniki pokazują jednak, że także i w jeziorach grupy Północnej są obecne geny toksyczności charakterystyczne dla *Planktothrix* spp. W roku 2011 toksyczne genotypy tego rodzaju wykrywano tylko w jeziorze Kisajno, które jest połączone bezpośrednim kanałem z jeziorem Niegocin, należącym do grupy Środkowej. Jezioro Mamry, na północnym krańcu systemu WJM było wolne od toksycznego *Planktothrix* spp. Jednak w kolejnym roku

gen *mcyA* należący do *Planktothrix* spp., był już wykrywany i w tym jeziorze. Na podstawie tylko dwóch lat badań nie można stwierdzić, czy toksyczne *Planktothrix* spp. było obecne w jeziorze Mamry już wcześniej, a rok 2011 był jedynie wyjątkiem, kiedy liczebność toksycznych komórek tego rodzaju była niewykrywalna. Jest jednak prawdopodobne, że badania prowadzone w 2011 i 2012 roku uchwyciły moment rozprzestrzeniania się kolejnego toksycznego taksonu do jeziora, w którym wcześniej on nie występował. Wyniki analiz obecności toksycznych genotypów pokazują, że pomimo zdecydowanych różnic zarówno cech morfometrycznych, jak i jakości wody, we wszystkich jeziorach systemu występują toksyczne szczepy cyjanobakterii, a ich rozprzestrzenianie się jest ułatwione dzięki połączeniu wszystkich jezior ze sobą.

6.1.6. Potencjalnie toksyczne pikocyjanobakterie w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

Pikocyjanobakterie, czyli najmniejsze znane sinice zostały odkryte stosunkowo późno, bo w latach 70 XX wieku (Johnson i Sieburth 1979). Słodkowodne pikocyjanobakterie należą do rodzajów *Synechococcus* i *Cyanobium* (Callieri 2008, Jasser i Callieri 2017) i mimo, że przed długi czas ich znaczenie w ekosystemach wodnych było nieznane i pomijane, obecnie wiadomo, że zwłaszcza w oligo- i mezotroficznym zbiornikach wodnych mogą być często głównymi producentami pierwotnymi (Callieri i Stockner 2002). Również fitoplankton wód o wyższym statusie troficznym może być w pewnych warunkach zdominowany przez pikocyjanobakterie (Carrick i Schelske 1997, Jasser i wsp. 2009). Pikocyjanobakterie powszechnie występują w Wielkich Jeziorach Mazurskich, a w latach 2007 i 2008 wyizolowano z nich 43 szczepy należące do rodzaju *Synechococcus* (Jasser i wsp. 2011).

Analizy przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały w jednym ze szczepów (BE0807B), wyizolowanym z jeziora Beldany, obecność trzech genów klastra *mcy*, odpowiadającego za wytwarzanie mikrocystyn. Pikocyjanobakterie przez długi czas uważane były za nietoksyczne, jednak coraz częściej pojawiają się informacje potwierdzające, że i w tej grupie sinic istnieją toksyczne szczepy. Cox i wsp. (2005) potwierdzili, że pikocyjanobakterie wytwarzają neurotoksynę BMAA. Istnieje sporo prac, które potwierdzają, że pikocyjanobakterie mogą też produkować mikrocystyny z grupy hepatotoksyn. Oudra i wsp. (2002) wykryli szczepy *Synechocystis* spp. wytwarzające toksyny w sztucznym zbiorniku wodnym w Maroku. Zarówno testy ELISA, jak i HPLC potwierdziły, że szczepy te

wytwarzają pięć różnych rodzajów mikrocytyn. Carmichael i Li (2006) znaleźli cztery toksyczne szczepy *Synechococcus* spp., wytwarzające mikrocytynę-YR i -LR w słonym, sztucznym jeziorze Salton Sea w Kaliforni, USA. Wytwarzanie mikrocytyn wykazano za pomocą analiz ELISA i LC/MS. Testy ELISA potwierdziły też wytwarzanie mikrocytyn przez szczep *Synechococcus* sp. wyizolowany ze zbiornika wodnego w Cajati w Brazylii (Furtado i wsp. 2009).

Większość prac publikowanych do tej pory opierało się na badaniu obecności i stężenia mikrocytyn w szczepach pikocyjanobakterii, lub też na szacowaniu ich toksycznego działania za pomocą testów (np. na myszach). Nie istniały jednak dotychczas żadne analizy obecności genów toksyczności u szczepów pikocyjanobakterii. Sekwencje trzech genów z mazurskiego szczepu *Synechococcus* sp. BE0807B - *mcyA*, *mcyD* i *mcyE*, są pierwszymi znanymi sekwencjami klastra *mcy* należącego do pikocyjanobakterii (Bukowska i wsp. 2014b).

Przytoczone publikacje na temat toksycznych pikocyjanobakterii, jak i wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że pikocyjanobakterie powinny być uwzględniane w szacowaniu ryzyka toksycznymi zakwitami. Pikocyjanobakterie powszechnie występują w wodach Wielkich Jezior Mazurskich, więc jeśli istnieją wśród nich toksyczne szczepy, mogą one również stanowić potencjalne zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Dotychczas monitoring toksycznych zakwitów bardzo rzadko uwzględniał również pikocyjanobakterie. Ponieważ analiza sekwencji genów klastra *mcy* szczepu *Synechococcus* sp. BE0807B ujawniła, że wykazują one duże podobieństwo do genów *mcy* innych taksonów sinic (zwłaszcza rodzaju *Planktothrix*), również badania molekularne próbek środowiskowych mogą prowadzić do niewykrycia lub niedoszacowania obecności toksycznych szczepów pikocyjanobakterii.

6.1.7. Udział toksycznych komórek w populacjach cyjanobakterii z rodzajów *Microcystis* i *Planktothrix* w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich.

6.1.7.1. Metodologia analiz qPCR

W analizach wykorzystujących real-time PCR były stosowane wytyczne dotyczące niezbędnego minimum informacji do publikacji eksperymentów z ilościowym PCR (MIQE guidelines – Bustin i wsp. 2009). Eksperyment wykorzystujący qPCR zaprojektowano tak, żeby na jednej płycie móc kwantyfikować wszystkie cztery badane fragmenty DNA

(PC-IGS i *mcyB* dla *Microcystis* spp., 16S rRNA i *mcyA* dla *Planktothrix* spp.). Zastosowanie reakcji typu multiplex PCR umożliwiło oszacowanie całkowitej liczebności *Planktothrix* spp. i występowania potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp., oraz analogicznie całkowitej liczebności *Microcystis* spp. i liczebności potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp. w jednej mieszaninie reakcyjnej, czyli dokładnie na tej samej matrycy DNA. Pozwoliło to wyeliminować ewentualne błędy wynikające z nierównych stężeń cząsteczek DNA między mieszaninami reakcyjnymi, co mogłoby zaburzyć proporcje toksycznych genotypów do całkowitej liczby komórek danego taksonu.

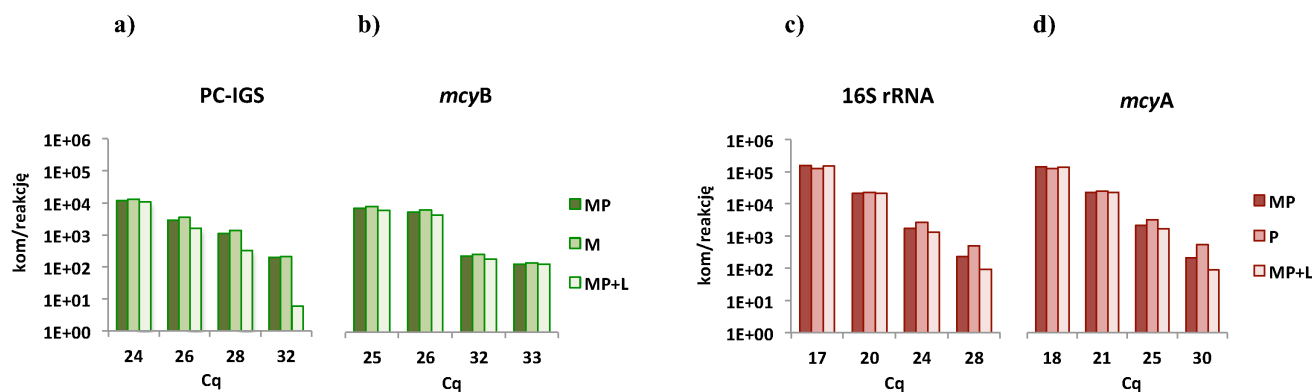
Pomimo, że wszystkie używane startery i sondy były opublikowane we wcześniejszych pracach i ich specyficzność była potwierdzona zarówno eksperymentalnie jak i *in silico* (Kurmayer i Kutzenberger 2003, Savichtcheva i wsp. 2011), przeprowadzono dodatkowe testy specyficzności. Sprawdzano wpływ obecności obcego DNA w próbce oraz tła środowiskowego na wydajność reakcji qPCR. Dlatego oprócz podstawowych krzywych standardowych (MP - do stworzenia których użyto mieszaniny DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* wyizolowanego z hodowlanych szczepów), próbki środowiskowe kwantyfikowano też na dodatkowych krzywych, w których matrycą było DNA tylko jednego ze szczepów (krzywe M i P), lub mieszanina DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii*, z dodatkiem DNA z próbki środowiskowej (Tałtowisko, wrzesień 2011 r.), w której mikroskopowo nie stwierdzono obecności *Microcystis* spp. i *Planktothrix* spp., ale stwierdzono obecność innych cyjanobakterii (krzywe MP+L). Parametry wszystkich krzywych standardowych znajdują się w Tabeli 22.

Tabela 22. Parametry głównych (MP) i dodatkowych (M lub P, MP+L) krzywych standardowych do analiz qPCR.

Target	Wariant krzywej	Wydażność (%)	Nachylenie	Przecięcie z osią y	R
PC-IGS	MP	102.8	-3.194	40.29	0.997
	M	96.0	-3.533	40.69	0.998
	MP+L	96.5	-3.501	35.06	0.997
mcyB	MP	101.9	-3.237	40.66	0.996
	M	95.6	-3.555	41.29	0.998
	MP+L	102.5	-3.201	42.39	0.973
16S rRNA	MP	101.3	-3.262	37.13	0.996
	P	93.0	-3.710	39.45	0.998
	MP+L	99.0	-3.373	34.70	1.000
mcyA	MP	98.9	-3.378	38.48	0.996
	P	92.4	-3.753	41.56	0.997
	MP+L	97.1	-3.469	36.13	1.000

MP – krzywa standardowa stworzona z mieszaniny DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* wyizolowanego z hodowlanych szczepów, M – krzywa standardowa stworzona z DNA z hodowlanego szczepu *Microcystis aeruginosa*, P – krzywa standardowa stworzona z DNA z hodowlanego szczepu *Planktothrix agardhii*, MP+L – krzywa standardowa stworzona z mieszaniny DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* z hodowlanych szczepów z dodatkiem DNA środowiskowego

Krzywe M i P prowadziły do niewielkiego przeszacowania liczebności komórek, w porównaniu do podstawowych krzywych MP (Rys. 33). Stosunek liczebności komórek oszacowanych na krzywych M i P do liczebności oszacowanych na krzywych MP wynosił średnio: 1,16 dla PC-IGS, 1,13 dla *mcyB*, 1,41 dla 16S rRNA i 1,53 dla *mcyA*. Użycie krzywych MP+L, przygotowanych z dodatkiem DNA środowiskowego, prowadziło natomiast do równie niewielkiego niedoszacowania liczebności komórek względem krzywych MP (Rys. 33). Stosunek liczebności oszacowanych na krzywych MP+L do liczebności na krzywych MP wynosił średnio: 0,43 dla PC-IGS, 0,85 dla *mcyB*, 0,83 dla 16S rRNA i 0,80 dla *mcyA*. Na skali logarytmicznej, stosowanej w kwantyfikacji przy pomocy qPCR, takie różnice są zanedbywalnie małe. Wszystkie stosowane rodzaje krzywych dały perfekcyjnie wzajemnie korelujące ($r^2 > 0,99$) wyniki liczebności komórek w próbkach środowiskowych, co pozwala stwierdzić, że wpływ zmieszania DNA z różnych taksonów, oraz wpływ ewentualnych pozostałości zanieczyszczeń z próbek środowiskowych był bardzo niewielki.



Rysunek 33. Porównanie wyników kwantyfikacji liczby komórek a) całkowitej liczby *Microcystis* spp., b) potencjalnie toksycznego *Microcystis* spp., c) całkowitej liczby *Planktothrix* spp., d) potencjalnie toksycznego *Planktothrix* spp. za pomocą krzywych standardowych MP (matrycą DNA do stworzenia krzywych była mieszanina DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii*), oraz dodatkowych krzywych: M – matrycą w krzywych było DNA *Microcystis aeruginosa*, P – matrycą było DNA *Planktothrix agardhii*, MP+L – matrycą była mieszanina DNA *Microcystis aeruginosa* i *Planktothrix agardhii* z dodatkiem DNA środowiskowego. Wykresy pokazują wybrane, w przypadku każdego z genów, 4 próbki środowiskowe o różnych Cq, mieszczących się w limitach detekcji krzywych.

Nie zdecydowano się używać do ostatecznej kwantyfikacji krzywych, w których do matrycy DNA dodano DNA środowiskowe (MP+L). Wyniki qPCR pokazały, że w próbkach środowiskowych, w których nie wykrywano za pomocą obserwacji mikroskopowych *Microcystis* spp. lub *Planktothrix* spp., mogą mimo wszystko znajdować się niewielkie ilości komórek tych taksonów. Taka sytuacja najprawdopodobniej miała miejsce w przypadku krzywej MP+L dla PC-IGS. Z powodu obecności w matrycy DNA użytej do stworzenia krzywej dodatkowych komórek *Microcystis* spp., na końcu krzywej kwantyfikującej najniższe liczebności komórek występowało o wiele większe niedoszacowanie liczebności *Microcystis* spp., aniżeli w pozostałych obszarach krzywej, gdzie wpływ śladowej ilości dodatkowych komórek był mało istotny (Rys. 33). Błędy w kwantyfikacji, wynikające z obecności dodatkowego DNA badanych taksonów w matrycy DNA używanej do stworzenia krzywych standardowych, byłyby większe i trudniejsze do oszacowania, niż niewielkie przeszacowanie liczebności komórek wynikające z zaniedbania wpływu tła środowiskowego (w kwantyfikacji na krzywych MP).

6.1.7.2. Zmiany udziału toksycznych genotypów w zespołach cyjanobakterii a możliwość przewidywania toksycznych zakwitów

Badania oparte na analizie DGGE-*mcyA* i sekwencjonowaniu wyodrębnionych na żelu poliakrylamidowym OTU, wykazały, że taksonami odpowiedzialnymi za wytwarzanie mikrocyzyn w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich są głównie cyjanobakterie z dwóch rodzajów: *Microcystis* i *Planktothrix*. Średnie całkowite liczebności komórek *Planktothrix* spp., oszacowane na podstawie analiz qPCR we wszystkich badanych próbkach, były o rząd wielkości wyższe, niż liczebności komórek *Microcystis* spp.

Udział toksycznych genotypów w całkowitej liczebności *Microcystis* spp. był zmienny, od 0 do 100%, jednak tylko w trzech badanych próbkach przekraczał 30%. Udział komórek *Microcystis* spp. zawierających klaster *mcy* w populacjach *Microcystis* spp., w dotychczas publikowanych badaniach wykorzystujących qPCR wynosił na przykład w niemieckim jeziorze Wansee 10-20% (Kurmayer i Christiansen 2008), w jeziorze Mikata w Japonii 0,5-35% (Yoshida i wsp. 2007), a w jeziorze Erie w USA 0,4-32% (Rinta-Kanto i wsp. 2005). Generalnie wieloletnie obserwacje wskazują, że w jeziorach półkuli północnej najczęściej udział toksycznych genotypów *Microcystis* spp. jest dość niski. Wskazuje to, że tylko niewielka część szczepów w populacjach tego rodzaju może być zaangażowana w produkcję mikrocyzyn (Kurmayer i wsp. 2003, Hotto i wsp. 2008). Stosunkowo mały udział komórek wytwarzających mikrocyzyn w populacjach *Microcystis* spp. może być wyjaśniony wcześniejszymi, niż do niedawna sądzono, zdarzeniami utraty klastra *mcy* w procesie ewolucji (Kurmayer i Christiansen 2008).

W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy nie zaobserwowano żadnej, potwierdzonej analizami statystycznymi tendencji, z jaką udział toksycznych komórek *Microcystis* spp. zmieniałby się w okresie sezonu wegetacyjnego. Dostępne dane literaturowe wskazują, że choć możliwe są sezonowe zmiany w udziale toksycznych genotypów w populacjach *Microcystis* spp., to nie zdarzają się one bardzo często (Christiansen i wsp. 2008, Yoshida i wsp. 2008). Zwykle proporcje komórek toksycznych i nietoksycznych są dość stałe. Co ciekawe gatunek *Microcystis aeruginosa*, wykazuje zwykle wyższy udział genotypów toksycznych (nawet > 70%), podczas gdy inne gatunki *Microcystis*, np. *M. ichthyoblabe* czy *M. wesenbergii* mają znacznie niższe proporcje komórek toksycznych do całkowitej liczebności (odpowiednio < 20% i 0%) (Kurmayer i Christiansen 2008). Badania Gągały (2012) prowadzone w polskim Zbiorniku Sulejowskim, w którym *M. aeruginosa* jest

gatunkiem dominującym w strukturze taksonomicznej cyjanobakterii, wykazały, że udział toksycznych komórek jest tam zmienny, ale może osiągać wysokie wartości (70%). Startery i sondy używane w analizach qPCR w niniejszej pracy, były specyficzne dla całego rodzaju *Microcystis*, dlatego na podstawie tych badań nie możemy stwierdzić, które gatunki były obecne w badanych jeziorach mazurskich. Jednak przeprowadzone mikroskopowe analizy fitoplanktonu potwierdzają, że dominującym gatunkiem z rodzaju *Microcystis* w jeziorach mazurskich jest *M. aeruginosa*, choć sporadycznie dominuje też *M. wesenbergii*. Uzyskiwane w badaniach wyniki zgadzają się z obserwacjami innych badaczy pod tym względem, że udział toksycznych genotypów *Microcystis* spp. jest najczęściej niski. Obecność w badanych jeziorach *M. aeruginosa* wskazuje jednak, że proporcje toksycznych do nietoksycznych komórek mogą też osiągać znacznie wyższe wartości. Taka sytuacja była, choć sporadycznie, notowana w badanych próbkach.

W odróżnieniu od *Microcystis* spp. u drugiego potencjalnie toksycznego rodzaju cyjanobakterii, występującego w Wielkich Jeziorach Mazurskich – *Planktothrix*, udział toksycznych genotypów był bardzo wysoki (od 75 do 100%). Zaobserwowano też, potwierdzoną analizami statystycznymi tendencję do zmniejszania się udziału komórek toksycznych w populacji, w czasie sezonu wegetacyjnego. Dane literaturowe wskazują, że proporcje toksycznych do nietoksycznych genotypów w populacjach rodzaju *Planktothrix* uzależnione są od gatunku *Planktothrix* występującego w danym zbiorniku wodnym. *Planktothrix rubescens*, posiadający w komórkach czerwony barwnik fikoerytrynę i występujący zwykle w głębokich, stratyfikowanych jeziorach, posiada najczęściej bardzo wysoki udział komórek zawierających geny *mcy* (Christiansen i wsp. 2008, Ostermaier i wsp. 2012). Badania Kurmayera i wsp. (2004) szczepów z jezior alpejskich i skandynawskich pokazały, że w tych populacjach wszystkie komórki *P. rubescens* posiadają klastery *mcy*. Natomiast u drugiego potencjalnie toksycznego gatunku *Planktothrix* – występującego najczęściej w płytszych jeziorach i posiadającego w komórkach fikocyjaninę i dzięki temu zielony kolor *P. agardhii*, zwykle udział komórek toksycznych jest dużo niższy (Christiansen i wsp. 2008). Typowo gatunek ten wykazuje też większą sezonową zmienność w proporcjach toksycznych do nietoksycznych komórek (Kurmayera i wsp. 2004). Kurmayera i wsp. (2011), badając duńskie, niemieckie i austriackie jeziora stwierdzili, że w zielono wybarwionych populacjach *Planktothrix* spp. udział procentowy toksycznych komórek wynosił średnio 31%, podczas gdy w tych czerwono zabarwionych średni udział wynosił 86%. Bardzo interesujący wydaje się zatem fakt, że w badanych Wielkich Jeziorach Mazurskich badania mikroskopowe

wykazały występowanie wyłącznie zielono wybarwionych gatunków *Planktothrix* sp., klasyfikowanych jako *P. agardhii*. Nie obserwowano za to występowania *P. rubescens*, na którego obecność mógłby wskazywać bardzo wysoki udział toksycznych komórek. Jednak nowe badania (Bukowska i wsp. *in press*), pokazują obecność w Jeziorach Mazurskich nietypowych szczepów *Planktothrix* spp., bardzo blisko spokrewnionych z *P. rubescens*, pomimo zielonego wybarwienia. Mogłoby to tłumaczyć tak wysoki udział toksycznych komórek we wszystkich badanych próbkach.

Udział toksycznych genotypów w całkowitej liczebności danego rodzaju cyjanobakterii może być bardzo ważnym wskaźnikiem, pozwalającym przewidywać możliwość wystąpienia toksycznego zakwitów we wczesnej fazie sezonu wegetacyjnego, jeszcze zanim biomasa cyjanobakterii zwiększy się znacząco. Jeśli będzie wiadomo, że udział komórek toksycznych osiągnie wysokie wartości podczas szczytu liczebności cyjanobakterii, wówczas prawdopodobne będzie, że stężenia mikrocystyn również będą wysokie. Żeby jednak móc przewidywać toksyczny zakwit, tendencje dotyczące udziału toksycznych genotypów w danym taksonie muszą być znane i stabilne. Na podstawie badań przeprowadzonych w niniejszej pracy można stwierdzić, że w przypadku mazurskich populacji *Microcystis* spp. nie można prognozować udziału toksycznych komórek w czasie sezonu, badając próbki pobierane wiosną, ponieważ zmienność proporcji toksycznych genotypów nie była w żaden sposób przewidywalna. Jednak liczebność *Microcystis* spp. w badanych jeziorach jest najczęściej na tyle mała, że nie stanowi on zwykle poważnego zagrożenia. Natomiast w przypadku drugiego badanego taksonu – *Planktothrix* spp. istnieje stały i powtarzalny w różnych jeziorach, oraz podczas dwóch lat badań wzór udziału toksycznych komórek w populacji. Wiosną procent komórek posiadających klaster *mcy* jest najwyższy i nieznacznie spada w czasie sezonu, jednak zawsze pozostaje wysoki (nie niższy niż 75%). Oznacza to, że przypadki osiągnięcia dużej biomasy przez mazurskie populacje *Planktothrix* spp. zawsze będą wiązały się z ryzykiem pojawienia się mikrocystyn w wodzie.

Analizując stężenia mikrocystyn w wodzie oraz ich całkowite stężenie w wodzie i komórkach sinic stwierdzono, że gdy liczebność przedstawicieli dwóch potencjalnie toksycznych rodzajów cyjanobakterii osiąga wartość $6,6 \times 10^6$ kom/l, całkowite stężenie mikrocystyn przekracza graniczne bezpieczne stężenie dla wód wykorzystywanych jako woda pitna (1 µg/l według normy WHO – WHO 2003). Podczas analiz przeprowadzanych w niniejszej pracy (w roku 2013) stężenia mikrocystyn w badanych jeziorach mazurskich nie były duże (najwyższe całkowite stężenie to 2,1 µg/l), jednak wcześniejsze badania tych jezior

pokazują, że stężenia mikrocystyn mogą osiągać dużo wyższe wartości – nawet 12 µg/l (Mankiewicz i wsp. 2005). Wykazano korelację pomiędzy liczebnością toksycznych komórek *Planktothrix* spp. a stężeniem toksyn, zarówno w rozpuszczonych wodzie, jak i stężeniem całkowitym (wolne i wewnątrzkomórkowe). Takich zależności nie znaleziono natomiast w przypadku *Microcystis* spp. Oznacza to, że głównym taksonem cyjanobakterii odpowiedzialnym za wytwarzanie mikrocystyn w badanych jeziorach mazurskich jest rodzaj *Planktothrix*. Wskazuje to też na konieczność zwracania szczególnej uwagi na ten takson podczas badań monitoringowych i być może wprowadzenia systemu alarmowego, w przypadku wykrycia wysokiej biomasy tego taksonu.

6.2. Degradacja mikrocystyn przez bakterie w badanych jeziorach systemu Wielkich Jezior Mazurskich

Obraz zależności środowiskowych związanych z toksycznymi mikrocystynami wytwarzanymi przez cyjanobakterie byłby niepełny bez poznania losów tych metabolitów po uwolnieniu ich z komórek sinic do wody. Ze względu na cykliczną strukturę i obecność niezwykle rzadkich aminokwasów, mikrocystyny są związkami bardzo trwałymi. W środowisku naturalnym mogą podlegać fotolitycznemu rozkładowi, jednak eksperymenty pokazują, że fotodegradacja przy udziale światła słonecznego nie jest efektywna (Tsuiji i wsp. 1994). Badania potwierdzają natomiast, że biodegradacja jest najefektywniejszym procesem usuwania mikrocystyn w ekosystemach wodnych (Ho i wsp. 2007a). Peptydowe hepatotoksyny nie ulegają jednak rozkładowi pod wpływem działania powszechnie występujących proteaz, z powodu posiadania w swojej strukturze β-aminokwasów (Okano i wsp. 2006, Geueke i Kohler 2007). Bakterie przeprowadzające proces rozkładu mikrocystyn muszą posiadać inne mechanizmy i szlaki degradacji.

W niniejszej pracy zbadano obecność bakterii zdolnych do rozkładania mikrocystyn w wodach i osadach dennych dziesięciu jezior systemu Wielkich Jezior Mazurskich. Markerami genetycznymi używanymi w tym celu były cztery geny z klastra *mlr*, kodującego szlak rozkładu toksyn. Nie wszystkie cztery geny wykrywano z równą częstotliwością. W wielu próbkach znajdowano tylko jeden, dwa lub trzy badane geny. Przypuszczalnie jest to spowodowane niewielką liczebnością bakterii posiadających klaster *mlr* w próbkach, w których nie wykryto wszystkich genów. Badane fragmenty DNA mogą mieć różną

wydajność amplifikacji z używanymi w eksperymentach starterami. Wykrycie tylko części szukanych genów może mieć miejsce w przypadku liczebności kopii genów *mlr* w próbce, będącej na granicy detekcji metody PCR. Obserwowane różnice w wykrywalności raczej nie wynikają z obecności w badanych próbkach bakterii z niefunkcjonalnym klastrem kodującym szlak degradacji mikrocystyn, na przykład z delecją któregoś z genów. W dostępnych danych literaturowych brak jest jakichkolwiek informacji, że klastery *mlr* mógłby podlegać tego typu mutacjom. W wynikach przyjęto więc, że w próbkach, w których znaleziono jakikolwiek fragment genu *mlr*, były obecne bakterie mogące degradować mikrocystyny.

Bakterie zdolne do rozkładania mikrocystyn wykryto w próbkach osadów dennych pobieranych latem i jesienią ze wszystkich badanych jezior, oraz w prawie wszystkich próbkach wiosennych. W próbkach wody natomiast obecność badanych bakterii stwierdzono tylko latem. Wiadomo, że bakterie przeprowadzające degradację mikrocystyn mogą występować w różnych środowiskach – w słodkowodnych jeziorach i rzekach (Jones i Orr 1994, Edwards i wsp. 2008), w wodach słonych i słonawych (Lemes i wsp. 2008), w osadach dennych (Chen i wsp. 2010a), jak również w sztucznych środowiskach np. filtrach uzdatniających wodę, a także oczyszczalniach ścieków (Lam i wsp. 1995, Ho i wsp. 2007b, Ho i wsp. 2010).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczebnościami cyjanobakterii a obecnością w wodzie strefy eufotycznej genów odpowiedzialnych za degradację, oraz między stężeniem mikrocystyn w wodzie a występowaniem badanych genów. Powstaje więc pytanie, czy występowanie w wodzie jeziornej bakterii posiadających geny *mlr* związane jest pojawianiem się toksycznych zakwitów cyjanobakterii w danym zbiorniku. Chen i wsp. (2008) zaobserwowali, że mikrobiologiczna degradacja mikrocystyn w jeziorze Taihu w Chinach zachodziła tylko wtedy, gdy w jeziorze trwał intensywny zakwit sinic. Nowsze badania (Shimizu i wsp. 2011) wykazują natomiast, że obecność mikrocystyn w wodzie aktywuje u bakterii ekspresję genów *mlr* odpowiedzialnych za rozkład tych związków. W świetle tych wyników wydaje się, że występowanie bakterii posiadających klastery *mlr* jest najczęściej skorelowane z występowaniem toksycznego zakwitu sinic. W niniejszej pracy nie udało się potwierdzić tych zależności. Stwierdzono tylko korelację między występowaniem bakterii posiadających geny *mlr* w wodzie powierzchniowej, a temperaturą wody. Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy obecnością genów *mlr* a aktualnym stanem troficznym jeziora definiowanym poprzez TSI. Najwyższa temperatura wody występowała w lecie (lipiec) i tylko wtedy wykrywano w niej geny *mlr*. Wiadomo, że takie warunki sprzyjają

większym liczebnościom cyjanobakterii i co za tym idzie wyższym stężeniom toksyn. Być może więc, ze względu na niewielką ilość danych nie udało się uchwycić konkretnych korelacji między tymi czynnikami, jednak obecność bakterii posiadających klaster *mlr* w tym momencie sezonu, w którym liczebności sinic są zwykle największe, może wskazywać, że istnieje powiązanie między występowaniem badanych bakterii a zakwitami sinicowymi. Związek procesów degradacji mikrocystyn na szlaku kodowanym przez geny *mlr* z temperaturą sugerują też inni autorzy, np. Ho i wsp. (2010) stwierdzili, że w wyższej temperaturze ekspresja tych genów zachodzi szybciej.

W osadach dennych za to geny odpowiedzialne za degradację mikrocystyn wykrywano przez cały czas trwania sezonu wegetacyjnego. Wiadomo, że w osadzie zwykle większa jest ogólna liczebność bakterii, niż w wodzie. Dodatkowo wyniki dotychczasowych badań wskazują, że w osadzie jest też większa różnorodność bakterii zdolnych do degradacji mikrocystyn (Teske i wsp. 2011). Toksyny te po uwolnieniu z komórek sinic mogą ulegać sorpcji w osadach dennych, gdzie są następnie rozkładane przez mikroorganizmy (Dillon i wsp. 2002). Procesy rozkładu mikrocystyn w osadach nie zależą od sezonu i zachodzą przez cały rok (Chen i wsp. 2008). Można więc założyć, że osady denne są naturalnym środowiskiem bytowania bakterii degradujących mikrocystyny, a wręcz są rezerwuarem tych bakterii, z którego mogą się one rozprzestrzeniać do wód powierzchniowych w sprzyjających warunkach (miksja wiosenna i jesienna wód jeziornych, polimiksja w płytkich jeziorach). Taka sytuacja miała najprawdopodobniej miejsce w badaniach opisywanych w niniejszej pracy.

Bakterie posiadające geny *mlr* mogą występować zarówno w osadach natlenionych, jak i odtlenionych (Ho i wsp. 2007a, Chen i wsp. 2010a). Co więcej, badania Holst i wsp. (2003), oraz Chen i wsp. (2010a) wskazują, że w warunkach beztlenowych proces degradacji zachodzi równie efektywnie co w tlenowych. Jest to ważne spostrzeżenie w kontekście warunków tlenowych w jeziorach mazurskich, ponieważ w wielu z nich latem panują przy dnie warunki beztlenowe. W lipcu 2013 r., kiedy prowadzone były badania warunki beztlenowe panowały w osadach pięciu na dziesięć badanych jezior.

Identyfikacja filogenetyczna bakterii degradujących mikrocystyny w próbkach pobranych z jezior mazurskich, na podstawie sekwencji czterech genów *mlr* wykazała, że wszystkie wykazują dużą homologię do sekwencji genów *mlr* z rodziny *Sphingomonadaceae*. Mimo, że nie udało się zidentyfikować konkretnych gatunków, wiadomo, że w badanych jeziorach występują bakterie z tej najlepiej poznanej grupy mikroorganizmów degradujących

mikrocystyny. Nie należy jednak zapominać, że najnowsze badania wskazują, że zdolność degradacji mikrocystyn może być bardzo szeroko rozpowszechniona w świecie bakterii. Przykładowo, metagenomowe badania Mou i wsp. (2013) wykazały, że bakterie degradujące mikrocystyny mogą należeć do 89 rzędów z wielu różnych klas bakterii. Inni autorzy wskazywali na zdolność do rozkładania toksyn sinicowych przez bakterie takie jak *Pseudomonas* spp. (Takenaka i Watanabe 1997, Ji i wsp. 2009), *Ralstonia solanacearum* (Yan i wsp. 2004), *Paucibacter toxinovorans* (Rapala i wsp. 2005), *Burkholderia* sp. (Lemes i wsp. 2008), *Methylbacillus* sp. (Hu i wsp. 2009), *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp. (Manage i wsp. 2009), *Morganella morganii* (Eleuterio i Batista 2010), *Microbacterium* sp., *Rhizobium gallicum* (Ramani i wsp. 2012). Wspólną cechą tych wszystkich bakterii, poza bakteriami należącymi do rodziny *Sphingomonadaceae* jest brak homologów genów klastra *mlr*. Jediną bakterią, która nie należy do tej rodziny, a której sekwencja genu *mlrA* znajduje się w bazie GenBank jest *Stenotrophomonas* sp. Nie poznano dotąd innych szlaków degradacji mikrocystyn, można jednak przypuszczać, że istnieje wiele różnych sposobów mikrobiologicznego rozkładu tych związków. W świetle tych doniesień należy przypuszczać, że również w badanych jeziorach mazurskich występują inne bakterie zdolne do degradacji mikrocystyn. Badania przeprowadzone w niniejszej pracy są tylko wstępem do pełnego poznania procesów mikrobiologicznego rozkładu toksyn sinicowych w tych jeziorach. Dalsza charakterystyka szlaków degradacji i taksonów w nie zaangażowanych może być bardzo ważna z punktu widzenia ochrony i rekultywacji wód. W literaturze znajdują się już opisy prób wykorzystania bakterii środowiskowych do oczyszczania zbiorników wodnych z hepatotoksyn (Sumino i wsp. 2008, Ji i wsp. 2009, Dziga i wsp. 2014), a duże nadzieje wiązane są z dalszym rozwojem tych metod.

7. Wnioski

- 1) Wykazano, że do pełnej identyfikacji składu taksonomicznego cyjanobakterii w zbiorniku wodnym nadal niezbędne są klasyczne metody mikroskopowe. Metody molekularne mogą być stosowane w celu identyfikacji taksonów dominujących w próbce, a dalszy rozwój baz danych z sekwencjami referencyjnymi może pozwolić w przyszłości na całkowite zastąpienie metod mikroskopowych.
- 2) We wszystkich badanych jeziorach mazurskich, bez względu na status troficzny, występuje duża różnorodność taksonomiczna cyjanobakterii. W większości jezior istnieje podobny potencjał występowania poszczególnych taksonów, a ich aktualna liczebność jest zależna od panujących warunków środowiskowych.
- 3) Czynnikiem, który w większym stopniu niż aktualny stan troficzny wpływa na kształtowanie się zbiorowisk sinic w badanych WJM jest pora roku. Wskazuje to, że zespoły cyjanobakterii w jeziorach zarówno o wysokiej jak i niskiej trofii mogą być w dużym stopniu podatne na zmiany klimatyczne.
- 4) Wykryto obecność genów klastra *mcy* w szczepie pikocyjanobakterii *Synechococcus* sp. wyizolowanym z WJM. Są to pierwsze znane sekwencje genów toksyczności u pikocyjanobakterii.
- 5) Opracowano procedurę rozpoznawania, jakie rodzaje cyjanobakterii mogących wytwarzać toksyny z grupy mikrocystyn występują w badanym jeziorze, z zastosowaniem analizy DGGE-*mcyA*.
- 6) W badanych jeziorach cyjanobakterie z rodzajów *Microcystis* i *Planktothrix* posiadają geny odpowiedzialne za wytwarzanie mikrocystyn.
- 7) Zaobserwowano rozprzestrzenianie się toksycznych genotypów *Planktothrix* spp. do jezior o niższym statusie troficznym w północnej części systemu WJM, w których wcześniej nie notowano ich obecności.
- 8) Udział toksycznych genotypów w populacjach *Microcystis* spp. w badanych jeziorach jest zwykle niski, ale może wykazywać dużą zmienność sezonową.
- 9) Udział toksycznych genotypów w populacjach *Planktothrix* spp. jest za to zawsze bardzo wysoki, choć nieznacznie spada w ciągu sezonu wegetacyjnego.
- 10) Na podstawie udziału toksycznych komórek w całkowitej liczebności *Planktothrix* spp. w próbkach pobieranych wiosną, można prognozować zagrożenie wystąpieniem toksycznego zakwitów w badanym jeziorze w późniejszej fazie sezonu.

- 11) Osiągnięcie dużych liczebności przez populacje *Planktothrix* spp. w jeziorach systemu WJM zawsze wiąże się z ryzykiem pojawienia się istotnych stężeń mikrocystyn w wodzie.
- 12) Gdy liczebność toksycznych genotypów w jeziorze osiąga wartość $6,6 \times 10^6$ kom/l, całkowite stężenie mikrocystyn przekracza graniczne bezpieczne stężenie dla wód wykorzystywanych jako woda pitna.
- 13) Głównym taksonem cyjanobakterii odpowiedzialnym za wytwarzanie mikrocystyn w badanych jeziorach mazurskich jest rodzaj *Planktothrix*.
- 14) Potwierdzono, że w badanych jeziorach systemu WJM występują bakterie należące do rodziny *Sphingomonadaceae*, które posiadają geny odpowiadające za degradację mikrocystyn.
- 15) Bakterie posiadające geny *mlr* występują przede wszystkim w osadach dennych, a do wód powierzchniowych mogą rozprzestrzeniać się w sprzyjających warunkach środowiska.

8. Cytowana literatura

1. Adrian R., O'Reilly C. M., Zagarese H., Baines S. B., Hessen D. O., Keller W., Livingstone D. M., Sommaruga R., Straile D., Van Donk E., Weyhenmeyer G. A., Winder M., 2009 Lakes as sentinels of climate change. *Limnol Oceanogr* 54, 2283-2297.
2. Alexova R., Haynes P. A., Ferrari B. C., Neilan B. A., 2011 Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Mol Cell Proteomics* 10, M110.003749.
3. Annadotter H., Cronberg G., Lawton L., Hansson H.-B., Göthe U., Skulberg O., 2001 An extensive outbreak of gastroenteritis associated with the toxic cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) in Scania, south Sweden. *Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences* 200-208, Springer-Verlag, Berlin.
4. Arar E. J., Collins G. B., 1997 Method 445.0 In vitro determination of chlorophyll a and pheophytin a in marine and freshwater algae by fluorescence. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
5. Azevedo S. M. F. O., Carmichael W. W., Jochimsen E. M., Rinehart K. L., Lau S., Shaw G. R., Eaglesham G. K., 2002 Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicology* 181, 441-446.
6. Badger M. R., Hanson D., Price G. D., 2002 Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Funct Plant Biol* 29, 161-173.
7. Banker P. D., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., Sukenik A., 1997 Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol* 33, 613-616.

8. Barica J., Vieira C., Fellowes M., 1992 Oscillations of algal biomass, nutrients and dissolved oxygen: methodology and data set analysis. National Water Research Institute Contribution Nr. 92-201, 148 S.
9. Bates B. C., Kundzewicz Z. W., Wu S., Palutikof J. P., 2008 Climate Change and Water. Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change 210 pp, IPCC Secretariat, Geneva.
10. Beattie K. A., Kaya K., Sano T., Codd G. A., 1998 Three dehydrobutyrine (Dhb)-containing microcystins from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Phytochemistry* 47, 1289-1292.
11. Behm D., 2003 Coroner cites algae in teen's death - experts are uncertain about toxin's role. *Milwaukee Journal Sentinel*, 6 September, p. 4.
12. Berman T., 2001 The role of DON and the effect of N : P ratios on occurrence of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinneret. *Limnol Oceanogr* 46, 443-447.
13. Billings W. H., 1981 Water-associated human illness in northeast Pennsylvania and its suspected association with blue-green algae blooms. *The Water Environment: Algal Toxins and Health* 243-255, Plenum Press, New York.
14. Bláha L., Maršálek B., 1999 Microcystin production and toxicity of picocyanobacteria as a risk factor for drinking water treatment plants. *Algol Stud* 92, 95-108.
15. Bolch C. J. S., Blackburn S. I., Neilan B. A., Grewe P. M., 1996 Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. *J Phycol* 32, 445-451.
16. Bolch C. J. S., Blackburn S. I., Jones G. J., Orr P. T., Grewe P. M., 1997 Plasmid content and distribution in the toxic cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann (Cyanobacteria: Chroococcales). *Phycologia* 36, 6-11.

17. Boopathi T., Ki J.-S., 2014 Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins* 6, 1951-1978.
18. Bourke A. T. C., Hawes R. B., Neilson A., Stallman N. D., 1983 An outbreak of hepatoenteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 21, 45-48.
19. Bourne D. G., Jones G. J., Blakeley R. L., Jones A., Negri A. P., Riddles P., 1996 Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl Environ Microb* 62, 4086-4094.
20. Bourne D. G., Riddles P., Jones G. J., Smith W., Blakeley R. L., 2001 Characterisation of a gene cluster involved in bacterial degradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR. *Environ Toxicol* 16, 523-534.
21. Bourne D. G., Blakeley R. I., Riddles P., Jones G. J., 2006 Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Res* 40, 1294-1302.
22. Briand E., Yéprémian C., Humbert J. F., Quiblier C., 2008 Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ Microbiol* 10, 3337-3348.
23. Brock T. D., 1973 Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. *The Biology of the Blue-Green Algae* 487-500, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
24. Bukowska A., Bielczynska A., Karnkowska-Ishikawa A., Chrost R. J., Jasser I., 2014a Molecular (PCR-DGGE) versus morphological approach: analysis of taxonomic composition of potentially toxic cyanobacteria in freshwater lakes. *Aquat Biosyst* 10, 2-11.

25. Bukowska A., Karnkowska-Ishikawa A., Jasser I., 2014b Microcystin-encoding gene cluster in *Synechococcus* strain isolated from Great Mazurian Lakes. Proceedings of The 15th International Conference on Harmful Algae 181-183.
26. Bukowska A., Kaliński T., Koper M., Kostrzevska-Szlakowska I., Kwiatowski J., Mazur-Marzec H., Jasser I., Predicting blooms of toxic cyanobacteria in eutrophic lakes with diverse cyanobacterial communities. *In press*
27. Burja A. M., Dhamwichukorn S., Wright P. C., 2003 Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. Trends Biotechnol 21, 504-511.
28. Burns C. W., 1968 Direct observations of mechanism regulating feeding behaviour of *Daphnia* in lake water. Int Revue ges Hydrobiol 53, 83-100.
29. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J., Wittwer C. T., 2009 The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55, 611-622.
30. Byth S., 1980 Palm Island mystery disease. Med. J. Aust 2, 40-42.
31. Callieri C., Stockner J. G., 2002 Freshwater autotrophic picoplankton: A review. J Limnol 61, 1-14.
32. Callieri C., 2008 Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. Freshwater Rev 1, 1-28.
33. Carmichael W. W., Jones C. L., Mahmood N. A., Theiss W. C., Krogh P., 1985 Algal toxins and water-based diseases. Crit Rev Environ Control 15, 275-313.
34. Carmichael W. W., 1991 Blue-green algae: an overlooked health threat. Health Environ Digest 5, 1-4.

35. Carmichael W. W., 1996 Cyanobacterial blooms and health hazards - an overview. *Toxicon* 34, 299.
36. Carmichael W. W., 1997 The cyanotoxins. *Adv Botan Res* 27, 211-256.
37. Carmichael W. W., Azevedo S. M. F. O., An J. S., Molica R. J. R., Jochimsen E. M., Lau S., Rinehart K. L., Shaw G. R., Eaglesham G. K., 2001 Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 109, 663-668.
38. Carmichael W. W., Li R., 2006 Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Syst* 2, 5.
39. Carlson R. E., 1977 A trophic state index for lakes. *Limnol Oceanogr* 22, 361-369.
40. Carpenter S. R., Kitchell J. F., 1992 Trophic cascade and biomanipulation: interface of research and management. A reply to the comment by De Melo et al. *Limnol Oceanogr*, 37, 208-213.
41. Carrick H. J., Schelske C. L., 1997 Have we overlooked the importance of small phytoplankton in productive waters? *Limnol Oceanogr* 42, 1613-1621.
42. Castenholz R. W., 1973 Ecology of blue-green algae in hot springs. *The Biology of Blue-Green Algae* 379-414. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
43. Chen W., Song L., Peng L., Wan N., Zhang X., Gan N., 2008 Reduction in microcystin concentrations in large and shallow lakes: water and sediment-interface contributions. *Water Res* 42, 763-773.
44. Chen X., Yang X., Yang L., Xiao B., Wu X., Wang J., Wan H., 2010a An effective pathway for the removal of microcystin LR via anoxic biodegradation in lake sediments. *Water Res* 44, 1884-1892.

45. Chen J., Hu L. B., Zhou W., Yan S. H., Yang J. D., Xue Y. F., Shi Z. Q., 2010b Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from Lake Taihu, China. *Int J Mol Sci* 11, 896-911.
46. Chiu A. S., Gehringer M. M., Braidy N., Guillemin G. J., Welch J. H., Neilan B. A., 2013 Gliotoxicity of the cyanotoxin, b-methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep* 3, 1482.
47. Chorus I., Bartram J., 1999 Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London, United Kingdom.
48. Christiansen G., Molitor C., Philmus B., Kurmayer R., 2008 Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Mol Biol Evol* 25, 1695–1704.
49. Chróst R. J., 1987 Phosphorus and microplankton development in an eutrophic lake. *Acta Microbiol Pol* 37, 205-225.
50. Chróst R. J., 1991 Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. *Microbial enzymes in aquatic environments* 29-59, Springer-Verlag.
51. Chróst R. J., Siuda W., 2006 Microbial production, utilization, and enzymatic degradation of organic matter in the upper trophogenic layer in the pelagial zone of lakes along a eutrophication gradient. *Limnol Oceanogr* 51, 749-762.
52. Coale K. H., 1991 Effects of iron, manganese, copper, and zinc enrichments on productivity and biomass in the Subarctic Pacific. *Limnol Oceanogr* 36, 1851-1864.

53. Codd G. A., Azevedo S. M. F. O., Bagchi S. N., Burch M. D., Carmichael W. W., Harding W.R., Kaya K., Utkilen H. C., 2005 CYANONET: A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management: Initial situation assessment and recommendations, International Hydrological Programme (IHP) of the United National Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO). IHP-VI, Technical Documents in Hydrology, Working Series SC-2005/WS/55.

54. Cottingham K. L., Chiavelli D. A., Taylor R. K., 2003 Environmental microbe and human pathogen: the ecology and microbiology of *Vibrio cholerae*. Front Ecol Environ 1, 80-86.

55. Cox P. A., Banack S. A., Murch S. J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R. R., Metcalf J. S., Morrison L. F., Codd G. A., Bergman B., 2005 Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proc Natl Acad Sci USA 102, 5074-5078.

56. Cox P. A., Richer R., Metcalf J. S., Banack S. A., Codd G. A., Bradley W. G., 2009 Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. Amyotroph Lateral Scler 10 Suppl 2, 109-117.

57. Crosbie N. D., Pöckl M., Weisse T., 2003a Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16SrRNA gene and *cpcBA* intergenic spacer sequence analyses. Appl Environ Microb 69, 5716-5721.

58. de la Cruz A. A., Antoniou M. G., Hiskia A., Pelaez M., Song W., O'Shea K. E., He X., Dionysiou D. D., 2011 Can we effectively degrade microcystins? - Implications on human health. Anticancer Agents Med Chem 11, 19-37.

59. Dean A. G., Jones T. C., 1972 Seasonal gastroenteritis and malabsorption at an American military base in the Philippines: I. Clinical and epidemiologic investigations of the acute illness. Am J Epidemiol 95, 111-127.

60. DeMott W. R., Gulati R.D., van Donk E., 2001 Daphnia food limitation in three hypereutrophic Dutch lakes: evidence for exclusion of large-bodied species by interfering filaments of cyanobacteria. *Limnol Oceanogr* 46, 2054-2060.
61. Deng L., Blank S., Sweetlove M., Obbels D., Verleyen E., Vyverman W., Kurmayer R., 2017 Monitoring of toxigenic cyanobacteria using next generation sequencing techniques. *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*, Rozdział 10, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey.
62. Diehnelt C. W., Dugan N. R., Peterman S. M., Budde W. L., 2006 Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Anal Chem* 78, 501-512.
63. Dignum M., Matthijs H. C. P., Pel R., Laanbroek H. J., Mur L. R., 2005 Nutrient limitation of freshwater Cyanobacteria: tools to monitor phosphorus limitation at the individual level. *Harmful Cyanobacteria* 65-86, Springer, Berlin.
64. Dillenberg H. O., Dehnelt M. K., 1960 Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can Med Assoc J* 83, 1151-1154.
65. Dillon P. J., Miller M., Fallowfield A., Hutson J., 2002 The potential of riverbank filtration for drinking water supplies in relation to microcystin removal in brackish aquifers. *J Hydrol* 266, 209-221.
66. Ding Y., Song L., Sedmak B., 2013 UVB Radiation as a potential selective factor favoring microcystin producing bloom forming cyanobacteria. *PLoS One* 8, e73919.
67. Dokulil M. T., Teubner K., 2000 Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438, 1-12.
68. Douglas S. E., 1994 Chloroplast origins and evolution. *The Molecular Biology of Cyanobacteria* 91-118, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

69. Downing T. G., Meyer C., Gehringer M. M., van de Venter M., 2005 Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ Toxicol* 20, 257-262.
70. Dzigă D., Władyka B., Zielińska G., Meriluoto J., Wasylewski M., 2012 Heterologous expression and characterisation of microcystinase. *Toxicon* 59, 578-586.
71. Dzigă D., Wasylewski M., Władyka B., Nybom S., Meriluoto J., 2013 Microbial degradation of microcystins. *Chem Res Toxicol* 26, 841-852.
72. Dzigă D., Liszniańska M., Władyka B., 2014 Bioreactor study employing bacteria with enhanced activity toward cyanobacterial toxins microcystins. *Toxins* 6, 2379-2392.
73. Dzigă D., Zielińska G., Władyka B., Bocheńska O., Maksylewicz A., Strzałka W., Meriluoto J. 2016 Characterization of enzymatic activity of MlrB and MlrC proteins involved in bacterial degradation of cyanotoxins microcystins. *Toxins (Basel)* 8, 76.
74. Edwards C., Graham D., Fowler N., Lawton L. A., 2008 Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. *Chemosphere* 73, 1315-1321.
75. Eleuterio L., Batista J. R., 2010 Biodegradation studies and sequencing of microcystin-LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake. *Toxicon* 55, 1434-1442.
76. Falconer I. R., Beresford A. M., Runnegar M. T. C., 1983 Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust* 1, 511-514.
77. Fastner J., Erhard M., Carmichael W. W., Sun F., Rinehart K. L., Ronicke H. Chorus I., 1999b Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv für Hydrobiologie* 145, 147-163.

78. Fathalli A., Jenhani A. B., Moreira C., Azevedo J., Welker M., Romdhane M., Antunes A., Vasconcelos V., 2011 Genetic variability of the invasive cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* from Bir M'cherga reservoir (Tunisia). Arch Microbiol 193, 595-604.
79. Fay P., 1965 Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. J Gen Microbiol 39, 11-20.
80. Fay P., Van Baalen C., 1987 The Cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam.
81. Ferrão-Filho A. S., Azevedo S. M. F. O., DeMott W. R., 2000 Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. Freshwater Biol 45, 1-19.
82. Francis G., 1878 Poisonous Australian lake. Nature 18, 11-12.
83. Furtado A. L. F. F., Calijuri M. C., Lorenzi A. S., Honda R. Y., Genuário D. R., Fiore M. F., 2009 Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. Hydrobiologia 627, 195-209.
84. Gągała I., Mankiewicz-Boczek J., 2012 The natural degradation of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) in fresh water - the future of modern treatment systems and water quality improvement. Pol J Environ Stud 21, 1125-1139.
85. Gągała I., 2012 Wpływ czynników środowiskowych ze szczególnym uwzględnieniem roli bakterii na dynamikę występowania oraz toksyczność słodkowodnych sinic. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Łódzki.
86. Geueke B., Kohler H. P., 2007 Bacterial beta-peptidyl aminopeptidases: on the hydrolytic degradation of beta-peptides. Appl Microbiol Biotechnol 74, 1197-1204.

87. Giannuzzi L., Sedan D., Echenique R., Andrinolo D., 2011 An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs* 9, 2164-2175.
88. Gilbert J. J., 1994 Susceptibility of planktonic rotifers to a toxic strain of *Anabaena flos-aquae*. *Limnol Oceanogr* 39, 1286-1297.
89. Ginn H. P., Pearson L. A., Neilan B. A., 2010 NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl Environ Microbiol* 76, 4362–4368.
90. Gliwicz Z. M., Lampert W., 1990 Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology* 71, 691-702.
91. Gons H. J., Mur L. R., 1980 Energy requirements for growth and maintenance of *Scenedesmus protuberans* Fritsch in light-limited continuous cultures. *Arch Microbiol* 125, 9-17.
92. Gregoracci G. B., Nascimento J. R., Cabral A. S., Paranhos R., Valentin J. L., Thompson C. C., Thompson F. L., 2012 Structuring of bacterioplankton diversity in a large tropical bay. *PLoS One* 7, e31408.
93. Hamersley M. R., Woebken D., Boehrer B., Schultze M., Lavik G., Kuypers M. M., 2009 Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany). *Syst Appl Microbiol* 32, 571-582.
94. Harada K. I., Ohtani I., Iwamoto K., Suzuki M., Watanabe M. F., Watanabe M., Terao K., 1994 Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32, 73-84.
95. Harding W. R., Paxton B. R., 2001 Cyanobacteria in South Africa: A Review, Report to the Water Research Commission, WRC Report No: TT 153/01.

96. Hashimoto E. H., Kato H., Kawasaki Y., Nozawa Y., Tsuji K., Hirooka E. Y., Harada K., 2009 Further investigation of microbial degradation of microcystin using the advanced Marfey method. *Chem Res Toxicol* 22, 391-398.
97. Hawkins P. R., Runnegar M. T. C., Jackson A. R. B., Falconer I. R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol* 50, 1292-1295.
98. Hawkins P. R., Chandrasena N. R., Jones G. J., Humpage A. R., Falconer I. R., 1997 Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 35, 341-346.
99. Heise H. A., 1949 Symptoms of hay fever caused by algae. *J Allergy* 20, 383-385.
100. Henriksen P., Carmichael W. W., An J., Moestrup Ø., 1997 Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 35, 901-913.
101. Hindák F., 1978 Sladkovodné riasy. Slovenské Pedagogické Nakladateľstvo, Bratislava.
102. Hindák F., 2008 Colour atlas of Cyanophytes. VEDA, Bratislava.
103. Hisbergues M., Christiansen G., Rouhiainen L., Sivonen K., Börner T. 2003 PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 180, 402-410.
104. Ho L., Gaudieux A. L., Fanok S., Newcombe G., Humpage A. R., 2007a Bacterial degradation of microcystin toxins in drinking water eliminates their toxicity. *Toxicon* 50, 438-441.

105. Ho L., Hoefel D., Saint C. P., Newcombe G., 2007b Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. *Water Res* 41, 4685-4695.
106. Ho L., Hoefel D., Palazot S., Sawade E., Newcombe G., Saint C. P., Brookes J. D., 2010 Investigations into the biodegradation of microcystin-LR in wastewaters. *J Hazard Mater* 180, 628-633.
107. Hofmann N., Beaulieu M. S., 2001 A geographic profile of manure production in Canada. *Statistics Canada*.
108. Holst T., Jørgensen N. O., Jørgensen C., Johansen A., 2003 Degradation of microcystin in sediments at oxic and anoxic, denitrifying conditions. *Water Res* 37, 4748-4760.
109. Hotto A., Satchwell M., Berry D., Gobler C., Boyer G., 2008 Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7, 671-681.
110. Hu L. B., Yang J. D., Zhou W., Yin Y. F., Chen J., Shi Z. Q., 2009 Isolation of a *Methylobacillus* sp. that degrades microcystin toxins associated with cyanobacteria. *N Biotechnol* 26, 205-211.
111. Huisman J., Weissing F. J., 1999 Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* 402, 407-410.
112. Huisman J., Hulot F. D., 2005 Population dynamics of harmful cyanobacteria: factors affecting species composition. *Harmful Cyanobacteria* 143-176, Springer, Berlin.
113. Jacquet S., Briand J.-F., Leboulanger C., Avois-Jacquet C., Oberhaus L., Tassin B., Vincon-Leite B., Paolini G., Druart J.-C., Anneville O., Humbert J.-F., 2005 The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 4, 651-672.

114. Jakubowska N., Szelaż-Wasielewska E., 2015 Toxic picoplanktonic Cyanobacteria – review. *Mar Drugs*, 13 1497-1518.

115. Janse I., Meima M., Kardinaal W.E., Zwart G., 2003 High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69, 6634-6643.

116. Jasser I., Kostrzevska-Szlakowska I., Ejsmont-Karabin J., Kalinowska K., Węgleńska T., 2009 Autotrophic versus heterotrophic production and components of trophic chain in humic lakes: the role of microbial communities. *Pol J Ecol* 57, 423-439.

117. Jasser I., Karnkowska-Ishikawa A., Kozłowska E., Królicka A., Łukomska-Kowalczyk M., 2010 Composition of picocyanobacteria community in the Great Mazurian Lakes: isolation of phycoerythrin-rich and phycocyanin-rich ecotypes from the system - comparison of two methods. *Pol J Microbiol* 59, 21-31.

118. Jasser I., Królicka A., Karnkowska-Ishikawa A., 2011 A novel phylogenetic clade of picocyanobacteria from the Mazurian lakes (Poland) reflects the early ontogeny of glacial lakes. *FEMS Microbiol Ecol* 75, 89-98.

119. Jasser I., Królicka A., Jakubiec K., Chróst R. J., 2013 Seasonal and spatial diversity of picocyanobacteria community in the Great Mazurian Lakes derived from DGGE analyses of ITS region of rDNA and *cpcBAIGS* [corrected] markers. *J Microbiol Biotechnol* 23: 739-749.

120. Jasser I., Bukowska A., Humbert J.-F., Haukka K., Fewer D. P., 2017 Analysis of toxigenic cyanobacterial communities through denaturing gradient gel electrophoresis. *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*, Rozdział 9, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey.

121. Jasser I., Callieri C., 2017 Picocyanobacteria: the smallest cell-size cyanobacteria. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis, Rozdział 3, Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
122. Ji R. P., Lu X. W., Li X. N., Pu Y. P., 2009 Biological degradation of algae and microcystins by microbial enrichment on artificial media. *Ecol Eng* 35, 1584-1588.
123. Jiang Y., Shao J., Wu X., Xu Y., Li R., 2011 Active and silent members in the mlr gene cluster of a microcystin-degrading bacterium isolated from Lake Taihu, China. *FEMS Microbiol Lett* 322, 108-114.
124. Johnson P. W., Sieburth J. McN., 1979 Chroococcoid cyanobacteria in the sea; a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol Oceanogr* 24, 928-935.
125. Jones G. J., Orr P. T., 1994 Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 28, 871-876.
126. Kaebernick M., Neilan B. A., Börner T., Dittmann E., 2000 Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 66, 3387-3392.
127. Kaebernick M., Dittmann E., Börner T., Neilan B. A., 2002 Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Appl Environ Microbiol* 68, 449-455.
128. Kardinaal W. E. A., Visser P. M., 2005 Dynamics of cyanobacterial toxins: sources of variability in microcystin concentrations. *Harmful Cyanobacteria* 41-63, Springer, Berlin.
129. Kardinaal W. E., Tonk L., Janse I., Hol S., Slot P., Huisman J., Visser P. M., 2007 Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl Environ Microbiol* 73, 2939-2946.

130. Katsev S., Tsandev I., L'Heureux I., Rancourt D. G., 2006 Factors controlling long-term phosphorus efflux from lake sediments: exploratory reactive-transport modeling. *Chem Geol* 234, 127-147.
131. Kauppinen E. S., 2013 Trophic state of the Great Masurian Lakes system in the past, present and future - causes, mechanisms and effects of changes. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski.
132. Kearns K. D., Hunter M. D., 2001 Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microb Ecol* 42, 80-86.
133. Kokociński M., Meriluoto J., Spoof L., Gągała I., Jurczak T., Rejmonczyk E., Mankiewicz-Boczek J., 2011 Distribution and potential producers of cylindrospermopsin in western Poland. *Eur J Phycol* 46, 130-131.
134. Kol E., 1968 Kryobiologie. I. Kryovegetation. Die Binnengewässer, Band XXIV, 216 pp. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
135. Komárek J., 2001 Review of the cyanoprokaryotic genus *Romeria*. *Czech Phycol* 1, 5-19.
136. Komárek J., Komárkova J., 2002 Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycol* 2, 1-24.
137. Komárek J., Komárkova J., 2004 Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycol* 4, 1-18.
138. Komárek J., Komárkova J., 2006 Diversity of *Aphanizomenon*-like cyanobacteria. *Czech Phycol* 6, 1-32.
139. Komárek J., Zapomělová E., 2007 Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 1. part: coiled types. *Fottea* 7, 1-31.

140. Komárek J., Anagnostidis K., 2008a Cyanoprokaryota 1. Teil: chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol. 1, Spektrum Akademischer Verlag.
141. Komárek J., Anagnostidis K., 2008b Cyanoprokaryota 2. Teil oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa, vol. 2, Spektrum Akademischer Verlag.
142. Komárek J., Zapomělová E., 2008 Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 2. part: straight types. Fottea 8, 1-14.
143. Koroleff F., 1983 Determination of phosphorus. Methods of seawater analysis: second, revised and extended edition 125-131, Verlag Chemie, Weinheim.
144. Kurmayer R., Christiansen G., Chorus I., 2003 The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. Appl Environ Microbiol 69, 787-795.
145. Kurmayer R., Kutzenberger T., 2003 Application of realtime PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. Appl Environ Microbiol 69, 6723-6730.
146. Kurmayer R., Christiansen G., Fastner J., Börner T., 2004 Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. Environ Microbiol 6, 831-841.
147. Kurmayer R., Christiansen G. 2008 The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria. Freshw Rev 2, 31-50.
148. Kurmayer R., Schober E., Tonk L., Visser P. M., Christiansen G., 2011 Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. FEMS Microbiol Lett 317, 127-137.

149. Laamanen M., 1996 Cyanoprokaryotes in the Baltic Sea ice and winter plankton. Arch Hydrobiol Suppl 117, Algological Studies 83, 423-433.
150. Lam A. K., Fedorak P. M., Prepas E. E., 1995 Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. Environ Sci Technol 29, 242-246.
151. Lean D. R. S., Pick F. R., 1981 Photosynthetic response of lake plankton to nutrient enrichment: a test for nutrient limitation. Limnol Oceanogr 26, 1001-1019.
152. Lee J. G., Roberts S. B., Morel F. M. M., 1995 Cadmium: a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Limnol Oceanogr 40, 1056-1063.
153. Lemes G. A., Kersanach R., Pinto Lda S., Dellagostin O. A., Yunes J. S., Matthiensen A., 2008 Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. Ecotoxicol Environ Saf 69, 358-365.
154. Lepere C., Wilmotte A., Meyer B., 2000 Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. Syst Geogr Plants 70, 275-283.
155. Lippy E. C., Erb J., 1976 Gastrointestinal illness at Sewickley, Pa. J Am Water Works Assoc 68, 606-610.
156. Long B. M., Jones G. J., Orr P. T., 2001 Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. Appl Environ Microbiol 67, 278-283.
157. Luo W., Chen H., Lei A., Lu J., Hu Z., 2014 Estimating cyanobacteria community dynamics and its relationship with environmental factors. Int J Environ Res Public Health 11, 1141-1160.

158. Manage P. M., Edwards C., Singh B. K., Lawton L. A., 2009 Isolation and identification of novel microcystin-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol* 75, 6924-6928.
159. Mankiewicz J., Komárková J., Izydorczyk K., Jurczak T., Tarczyska M., Zalewski M., 2005 Hepatotoxic cyanobacterial blooms in the lakes of northern Poland. *Environ Toxicol* 20, 499-506.
160. Masseret E., Banack S., Boumédiène F., Abadie E., Brient L., Pernet F., Juntas-Morales R., Pageot N., Metcalf J., Cox P., Camu W., 2013 Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France. *PLoS One* 8, e83406.
161. Matsunaga S., Moore R. E., Niemczura W. P., Carmichael W. W., 1989 Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J Amer Chem Soc* 111, 8021-8023.
162. May V., McBarron E. J., 1973 Occurrence of the blue-green alga *Anabaena circinalis* Rabenh., in New South Wales and toxicity to mice and honey bees. *J Austral Inst Agric Sci* 39, 264-266.
163. Metcalf J. S., Codd G. A., 2004 Cyanobacterial toxins in the water environment. Foundation for Water Research, UK.
164. Mikulski Z. 1966 Bilans wodny Wielkich Jezior Mazurskich. Państwowy Instytut Hydrologiczno-Meteorologiczny, Warszawa.
165. Miller A. P., Tisdale E. S., 1931 Public health engineering: epidemic of intestinal disorders in Charleston, W. Va., occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am J Public Health* 21, 198-200.

166. Miller M. A., Kudela R. M., Mekebri A., Crane D., Oates S. C., Tinker M. T., Staedler M., Miller W. A., Toy-Choutka S., Dominik C., Hardin D., Langlois G., Murray M., Ward K., Jessup D. A., 2010. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: Cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS One* 5, e12576.
167. Morel F. M. M., Reinfelder J. R., Roberts S. B., Chamberlain C. P., Lee J. G., Yee D., 1994 Zinc and carbon co-limitation of marine phytoplankton. *Nature* 369, 740-742.
168. Mou X., Lu X., Jacob J., Sun S., Heath R., 2013 Metagenomic identification of bacterioplankton taxa and pathways involved in microcystin degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8, e61890.
169. Murch S. J., Cox P. A., Banack S. A., Steele J. C., Sacks O. W., 2004 Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110, 267-269.
170. Murphy J., Rilley J. P., 1962 A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27, 31-36.
171. Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695-700.
172. Müller-Navarra D. C., Brett M. T., Park S., Chandra S., Ballantyne A. P., Zorita E., Goldman C. R., 2004 Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature* 427, 69-72.
173. Napiórkowska-Krzebietke A., Hutorowicz A., 2006 Long-term changes of phytoplankton in Lake Niegocin, in the Masurian Lake Region, Poland. *Oceanol Hydrobiol Stud* 35, 209-226.

174. Napiórkowska-Krzebietke A., Wierzchowska M., Błocka B., Hutorowicz J., Hutorowicz A., Zdanowski B., 2007 Changes in the trophic state of Lake Niegocin after the modernization of a local wastewater treatment plant. *Limnol Rev* 7, 153-159.
175. Napiórkowska-Krzebietke A., 2015 Cyanobacterial bloom intensity in the ecologically relevant state of lakes – an approach to Water Framework Directive implementation. *Oceanol Hydrobiol Stud* 44, 97-108.
176. Nishizawa T., Asayama M., Fujii K., Harada K., Shirai M., 1999 Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem* 126, 520-529.
177. Nybom S. M., Salminen S. J., Meriluoto J. A., 2007 Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 270, 27-33.
178. Odum E. P., 1971 *Podstawy ekologii*, wydanie III, PWRiL Warszawa 1982.
179. OECD, Organization of Economic Cooperation and Development 1982: *Eutrophication of waters: monitoring, assessment and control*. OECD, Paris.
180. Oh K. H., Jeong D. H., Shin S. H., Cho Y. C., 2012 Simultaneous quantification of cyanobacteria and *Microcystis* spp. using real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol* 22, 248-255.
181. Okano K., Maseda H., Sugita K., 2006 Biochemical characteristics of microcystin LR degradation by typical protease. *Jpn J Water Treat Biol* 42, 27-35.
182. Orr P. T., Jones G. J., 1998 Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 43, 1604-1614.
183. Ostermaier V., Kurmayer R., 2009 Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microb Ecol* 58, 323-333.

184. Ostermaier V., Schanz F., Köster O., Kurmayer R., 2012 Stability of toxin gene proportion in red-pigmented populations of the cyanobacterium *Planktothrix* during 29 years of re-oligotrophication of Lake Zurich. BMC Biol 10, 100.
185. Oudra B., Loudiki M., Vasconcelos V., Sabour B., Sbiyyaa B., Oufdou Kh., Mezrioul N., 2002 Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. Environ Toxicol 17, 32-9.
186. Özkundakci D., Hamilton D. P., Gibbs M. M., 2011 Hypolimnetic phosphorus and nitrogen dynamics in a small, eutrophic lake with a seasonally anoxic hypolimnion. Hydrobiologia 661, 5-20.
187. Paerl H.W., Huisman J., 2008 Climate. Blooms like it hot. Science 320, 57-58.
188. Paerl H.W., Huisman J., 2009 Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Env Microbiol Rep 1, 27-37.
189. Paerl H. W., Otten T. G., 2013 Environmental science. Blooms bite the hand that feeds them. Science 342, 433-434.
190. Palinska K. A., Deventer B., Hariri K., Lotocka M., 2011 A taxonomic study on *Phormidium*-group (Cyanobacteria) based on morphology, pigments, RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment. Fottea 11, 41-55.
191. Pearson M. J., Ferguson A. J. D., Codd G. A., Reynolds C. S., Fawell J. K., Hamilton R. M., Howards S. R., Attwood M. R., 1990 Toxic blue-green algae: a report by the National Rivers Authority. Water Quality Series No: 2, London.
192. Pearson L. A., Neilan B. A., 2008 The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. Curr Opin Biotech 19, 281-288.

193. Petterson K., Herlitz E., Istvánovics V., 1993 The role of *Gloeotrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. *Hydrobiologia* 253, 123-129.
194. Petterson K., 1998 Mechanisms for internal loading of phosphorus in lakes. *Hydrobiologia* 373, 21-25.
195. Pizzolon L., Tracanna B., Prósperi C., Guerrero J. M., 1999 Cyanobacterial blooms in Argentinean inland waters. *Lakes Reserv Res Manage* 4, 101-105
196. Pliński M., Komárek J., 2007 Flora Zatoki Gdańskiej i wód przyległych (Bałtyk Południowy). *Sinice - Cyanobakterie (Cyanoprokaryota)*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.
197. Porter K. G., Feig Y. S., 1980 The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25, 943-948.
198. Prairie Y. T., COLE J. J., 2009 Carbon, unifying currency. *Encyclopedia of Inland Waters* 2, Oxford: Elsevier.
199. Prepas E. E., Kotak B. G., Campbell L. M., Evans J. C., Hrudey S. E., Holmes C. F. B., 1997 Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*. *Can J Fish Aquat Sci* 54, 41-46.
200. Price G. D., Badger M. R., 2002 Advances in understanding how aquatic photosynthetic organisms utilize sources of dissolved inorganic carbon for CO₂ fixation. *Funct Plant Biol* 29, 117-121.
201. Prinsep M. R., Caplan F. R., Moore R. E., Patterson G. M. L., Honkanen R. E., Boynton A. L., 1992 Microcystin-LR from a blue-green alga belonging to the *Stigonematales*. *Phytochemistry* 31, 1247-1248.

202. Pybus M. J., Hobson D. P., Onderka D. K., 1986 Mass mortality of bats due to probable blue-green algal toxicity. *J Wildl Dis* 22, 449-450.
203. Rai A. N., 1990 *CRC Handbook of symbiotic Cyanobacteria* p. 253, CRC Press, Boca Raton.
204. Ramani A., Rein K., Shetty K. G., Jayachandran K., 2012 Microbial degradation of microcystin in Florida's freshwaters. *Biodegradation* 23, 35-45.
205. Rantala A., Fewer D. P., Hisbergues M., Rouhiainen L., Vaitomaa J., Börner T., Sivonen K., 2004 Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 568-573.
206. Rantala-Ylinen A., Sivonen K., Wilmotte A., 2017 *DNA (diagnostic) microarray. Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*, Rozdział 8, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey.
207. Rapala J., Robertson A., Negri A. P., Berg K. A., Tuomi P., Lyra C., Erkomaa K., Lahti K., Hoppu K., Lepistö L., 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ Toxicol* 20, 331-340.
208. Raven J.A., 1985 The CO₂ concentrating mechanism. *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms* 67-83, Waverly Press, Baltimore, USA.
209. Reinikainen M., Lindvall F., Meriluoto J. A. O., Repka S., Sivonen K., Spoof L., Wahlsten M., 2002 Effects of dissolved cyanobacterial toxins on the survival and egg hatching of estuarine calanoid copepods. *Mar Biol* 140, 577-583.
210. Reuter J. G., Petersen R. R., 1987 Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *N Zea J Mar Freshwat Res* 21, 435-445.

211. Reynolds C. S., Wiseman S. W., Clarke M. J. O., 1984 Growth- and loss-rate responses of phytoplankton to intermittent artificial mixing and their potential application to the control of planktonic algal biomass. *J Appl Ecol* 21, 11-39.
212. Richardson L. L., Sekar R., Myers J. L., Gantar M., Voss J. D., Kaczmarsky L., Remily E. R., Boyer G. L., Zimba P. V., 2007 The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. *FEMS Microbiol Lett* 272, 182-187.
213. Rinta-Kanto J. M., Ouelette A. J. A., Boye, G. L., Twiss M. R., Bridgeman T. B., Wilhelm S. W., 2005 Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in Western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ Sci Technol* 39, 4198-4205.
214. Robarts R. D., Zohary T., 1987 Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N Zea J Mar Freshwat Res* 21, 391-399.
215. Rychlik W., 1995 Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol* 3, 129-134.
216. Saito T., Okano K., Park H. D., Itayama T., Inamori Y., Neilan B. A., Burns B. P., Sugiura N., 2003 Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiol Lett* 229, 271-276.
217. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
218. Saunders D. L., Kalff J., 2001 Nitrogen retention in wetlands, lakes and rivers. *Hydrobiologia* 443, 205-212.

219. Savichtcheva O., Debroas D., Kurmayer R., Villar C., Jenny J. P., Arnaud F., Perga M. E., Domaizon I., 2011 Quantitative PCR enumeration of total/toxic *Planktothrix rubescens* and total cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Appl Environ Microbiol* 77, 8744-8753.
220. Scheldman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Mühling M., Whitton B. A., Belay A., Wilmotte A., 1999 *Arthrospira (Spirulina)* strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiol Lett* 172, 213-222.
221. Schindler D. W., 1971 Carbon, nitrogen, phosphorus and the eutrophication of freshwater lakes. *J Phycol* 7, 321-329.
222. Schindler D. W., 1975 Whole-lake fertilization experiments with phosphorus, nitrogen, and carbon. *Int Ver Theor Angew Limnol Verh* 19, 3221-3231.
223. Schindler D. W., 1978 Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol Oceanogr* 23, 478-486.
224. Schopf J. W., 1996 Cyanobacteria. Pioneers of the early Earth. Contributions in Phycology 13-32, Nova Hedwigia, Beiheft 112, J. Cramer, Berlin.
225. Schönborn W., 2003 Defensive reactions of freshwater ecosystems against external influences. *Limnologica* 33, 163-189.
226. Schreurs H., 1992 Cyanobacterial dominance, relation to eutrophication and lake morphology. *Rozprawa doktorska*, University of Amsterdam.
227. Seitzinger S. P., 1988 Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnol Oceanogr* 33, 702-724.
228. Shapiro J., 1973 Blue-green algae: why they become dominant. *Science* 179, 382-384.

229. Shapiro J., 1990 Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Proceedings of the International Association of Theoretical and Applied Limnology* 24, 38-54.
230. Shimizu K., Maseda H., Okano K., Itayama T., Kawauchi Y., Chen R., Utsumi M., Zhang Z., Sugiura, N., 2011 How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity. *Lakes Reserv Res Manage* 16, 169-178.
231. Shimoda Y., Azim M. E., Perhar G., Ramin M., Kenney M. A., Sadraddini S., Gudimov A., Arhonditsis G. B., 2011 Our current understanding of lake ecosystem response to climate change: what have we really learned from the north temperate deep lakes? *J Great Lakes Res* 37, 173-193.
232. Siuda W., 1984 Phosphatases and their role in organic phosphorus transformation in natural waters: a review. *Pol Arch Hydrobiol* 31, 207-233.
233. Siuda W., 2001 Enzymatyczna regeneracja ortofosforanu w wodach jezior. *Postępy Mikrobiologii* 40, 187-217.
234. Siuda W., 2008 Fosfor, azot i węgiel a ewolucja statusu troficznego Wielkich Jezior Mazurskich. *Ochrona i Rekultywacja Wód Wielkich Jezior Mazurskich Narzędziem Rozwoju Naukowego, Gospodarczego, Społecznego i Kulturowego Regionu* 110-115, IRS, Olsztyn.
235. Siuda W., Chróst R. J., Kaliński T., 2013 Eutrofizacja południowej części kompleksu Wielkich Jezior Mazurskich (WJM) w latach 1977 – 2011. Przyczyny, mechanizmy i skutki. http://www.zemuw.pl/pl/files/docs/JM_Eutrofizacja_jezior_mazurskich.pdf
236. Sivonen K., Börner T., 2008 Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Caister Academic Press, Norfolk.

237. Skulberg O. M., 1996a Terrestrial and limnic algae and cyanobacteria. A Catalogue of Svalbard Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria Part 9, 198, 383-395, Norsk Polarinstitut Skrifter.
238. Smith V. H., 1983 Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 221, 669-671.
239. Smith V. H., 2003 Eutrophication of freshwater and marine ecosystems: a global problem. *Environ Sci Pollut Res Int* 10, 126-139.
240. Smith V. H., Schindler D. W., 2009 Eutrophication science: where do we go from here? *Trends Ecol Evol* 24, 201-207.
241. Soong F. S., Maynard E., Kirke K., Luke C., 1992 Illness associated with blue-green algae. *Med J Aust* 156, 67.
242. Solorzano L., 1969 Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnol Oceanogr* 14, 799-801.
243. Søndergaard M., Jensen J. P., Jeppesen E., 1999 Internal phosphorus loading in shallow Danish lakes. *Hydrobiologia* 408, 145-152.
244. Søndergaard M., Jensen J. P., Jeppesen E., 2003 Role of sediment and internal loading of phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia* 506, 135-145.
245. Starmach K., 1966 Flora słodkowodna Polski 2. PWN, Warszawa.
246. Starmach K., 1989 Plankton roślinny wód słodkich: metody badania i klucze do oznaczania gatunków występujących w wodach Europy Środkowej. PWN, Warszawa-Kraków.

247. Stocker T., Qin D., Plattner G., Tignor M., Allen S., Boschung J., 2013 Climate change: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. IPCC, 2013.

248. Sukenik A., Eshkol R., Livne A., Hadas O., Rom M., Tchernov D., Vardi A., Kaplan A., 2002 Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (Cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism. *Limnol Oceanogr* 47, 1656-1663.

249. Sumino T., Ogasawara T., Park H. D., 2008 Method and equipment for treating microcystin-containing water. Patent US 7,425,267 B2.

250. Takenaka S., Watanabe M. F., 1997 Microcystin LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 34, 749-757.

251. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729.

252. Taşkan E., 2016 Performance of mixed algae for treatment of slaughterhouse wastewater and microbial community analysis. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 20474-20482.

253. Tavaré S., 1986 Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*. American Mathematical Society 17, 57-86.

254. Teixeira Mda G., Costa Mda C., De Carvalho V. L. P., Pereira Mdos S., Hage E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 27, 244-253.

255. Teske A., Durbin A., Ziervogel K., Cox C., Arnosti C., 2011 Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an arctic fjord of Svalbard. *Appl Environ Microbiol* 77, 2008-2018.

256. Tonk L., Visser P., Christiansen G., Dittmann E., Snelder E. D. F. M., Wiedner C., Mur L., Huisman J., 2005 The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Environ Microbiol* 71, 5177-5181.

257. Toruńska A., 2012 Oddziaływania pomiędzy cyjanobakterią z gatunku *Nodularia spumigena* i jej metabolitami a innymi mikroorganizmami z Zatoki Gdańskiej. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Gdański.

258. Trevino-Garrison I., DeMent J., Ahmed F. S., Haines-Lieber P., Langer T., Ménager H., Neff J., van der Merwe D., Carney E., 2015 Human illnesses and animal deaths associated with freshwater harmful algal blooms - Kansas. *Toxins* 7, 353-366.

259. Tsuji K., Naito S., Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M. F., Suzuki M., Harada K., 1994 Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. *Environ Sci Technol* 28, 173-177.

260. Tsuji K., Watanuki T., Kondo F., Watanabe M. F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Uchida H., Harada K.I., 1995 Stability of microcystins from cyanobacteria - II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 33, 1619-1631.

261. Turner P. C., Gammie A. J., Hollinrake K., Codd G. A., 1990 Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br Med J* 300, 1440-1441.

262. Utermöhl H., 1958 Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt Int Verein Limnol* 9, 1-38.

263. van Gremberghe I., Vanormelingen P., Van der Gucht K., Souffreau C., Vyverman W., De Meester L., 2009 Priority effects in experimental populations of the cyanobacterium *Microcystis*. *Environ Microbiol* 11, 2564-2573.

264. van Hoof F., 1994 The occurrence of toxic cyanobacteria in Europe (excluding the UK and Scandinavia). Toxic Cyanobacteria: Current Status of Research and Management. Australian Centre for Water Quality Research, Adelaide, Australia.
265. Velde M. V., 1931 An epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. Am J Public Health 21, 1227-1235.
266. Vezie C., Briant L., Sivonen K., Bertru G., Lefevre J. C., Salkinoja-Salonen M., 1998 Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Grand-Lieu lake (France). Microbiol Ecol 35, 126-135.
267. Vollenweider R. A., 1968 Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. OECD, Paris.
268. Vollenweider R. A., 1976 Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. Mem Ist Ital Idrobiol 33, 53-83.
269. Walsby A. E., 1978 The gas vesicles of aquatic prokaryotes. Relations Between Structure and Functioning in the Prokaryotic Cell, 338 pp. 28th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press.
270. Ward J. H. Jr., 1963 Hierarchical grouping to optimize an objective function. J Am Stat Assoc 58, 236-244.
271. Watanabe M. M., Kaya K., Takamura N., 1992 Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. J Phycol 28, 761-767.
272. Weber C. A., 1907 Aufbau und vegetation der moore Norddeutschlands. Beiblatt zu den Botanischen Jahrbuchern. 90, 19-34. <http://sammlungen.ub.uni-frankfurt.de/botanik/periodical/titleinfo/3727685>

273. Weers P. M. M., Gulati R. D., 1997 Effect of the addition of polyunsaturated fatty acids to the diet on the growth and fecundity of *Daphnia galeata*. *Freshw Biol* 38, 721-729.
274. Weirich C. A., Miller T. R., 2014 Freshwater harmful algal blooms: toxins and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 44, 2-24.
275. Welker M., Steinberg C., 1999 Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. *Water Res* 33, 1159-1164.
276. Wetzel R. G., 2001 *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Third edition, Academic Press, San Diego, USA.
277. WHO 2003 Cyanobacterial toxins: microcystin-LR in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality, Geneva, Szwajcaria.
278. Wiedner C., Rücker J., Brüggemann R., Nixdorf B., 2007 Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia* 152, 473-484.
279. Williamson M., Corbett S., 1993 Investigating health risks from riverine blooms of blue green algae. *New South Wales Public Health Bulletin* 4, 27-29.
280. Williamson G. E., Saros J. E., Schindler D. W., 2009 Sentinels of change. *Science* 323, 887-888.
281. Wilmotte A., Laughinghouse H. D., Rippka R., Salmaso N., 2017 Taxonomic identification of cyanobacteria by a polyphasic approach. *Molecular Tools for the Detection and Quantification of Toxigenic Cyanobacteria*, Rozdział 4, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey.

282. Wilson W. H., Carr N. G., Mann N. H., 1996 The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803. J Phycol 32, 506-516.
283. Wood R. 2016 Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure – a review of the literature. Environ Int 91, 276-282.
284. Yan H., Pan G., Zou H., Li X., Chen H., 2004 Effective removal of microcystins using carbon nanotubes embedded with bacteria. Chinese Sci Bull 49, 1694-1698.
285. Ye W., Liu X., Tan J., Li D., Yang H., 2009 Diversity and dynamics of microcystin-producing cyanobacteria in China's third largest lake, Lake Taihu. Harmful Algae 8, 637-644.
286. Yen H. K., Lin T. F., Tseng I. C., 2012 Detection and quantification of major toxigenic *Microcystis* genotypes in Moo-Tan reservoir and associated water treatment plant. J Environ Monit 14, 687-696.
287. Yoshida M., Yoshida T., Takashima Y., Hosoda N., Hiroishi S., 2007 Dynamics of microcystin-producing and nonmicrocystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. FEMS Microbiol Lett 266, 49-53.
288. Yoshida M., Yoshida T., Kashima A., Takashima Y., Hosoda N., Nagasaki K., Hiroishi S., 2008 Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. Appl Environ Microbiol 74, 3269-3273.
289. Zhang W., Lou I., Ung W. K., Kong Y., Mok K. M., 2014 Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir. Front Earth Sci 8, 291-301.

290. Zilberg B., 1966 Gastroenteritis in Salisbury: european children - a five-year study. Cent Afr J Med 12, 164-168.
291. Zilliges Y., Kehr J.-C., Meissner S., Ishida K., Mikkat S., Hagemann M., Kaplan A., Börner T., Dittmann E., 2011 The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. PLoS One 6, e17615.

9. Załączniki

Załącznik 1. Parametry biologiczne i fizyko-chemiczne badanych WJM

	Chlorofil _a (µg/l)										
	Maj			Lipiec			Sierpień			Wrzesień	
	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2013
Mamry	21,0	3,0	8,6	6,3	7,6	4,7	8,0	5,6	15,0	18,7	19,0
Kisajno	8,0	2,7	8,0	11,7	5,2	4,2	15,4	5,4	8,7	11,1	7,4
Niegocin	17,6	2,2	27,2	18,9	8,6	8,9	28,2	12,9	17,1	22,1	12,3
Tałtowisko	32,0	5,1	31,3	34,2	12,0	14,2	29,6	15,3	10,1	21,9	18,4
Tały	61,8	6,3	52,8	28,0	14,5	23,7	40,0	22,6	25,9	39,7	25,8
Mikołajskie	54,4	12,3	40,5	14,1	19,0	27,6	42,9	25,8	27,0	38,9	31,3
Śniardwy	23,9	7,1	18,0	22,7	19,2	18,9	43,2	29,3	9,8	64,6	29,6
Beldany	35,8	16,6	22,0	38,5	19,0	23,5	32,6	28,1	24,7	39,9	27,3

	Biomasa bakterii (mg C/l)					
	Maj		Lipiec		Sierpień	
	2011	2013	2011	2013	2011	2013
Mamry	0,154	0,095	0,080	0,098	0,107	0,120
Kisajno	0,091	0,111	0,052	0,098	0,066	0,116
Niegocin	0,147	0,199	0,055	0,148	0,077	0,151
Tałtowisko	0,448	0,216	0,059	0,158	0,046	0,100
Tały	0,105	0,221	0,065	0,192	0,052	0,098
Mikołajskie	0,075	0,235	0,053	0,111	0,051	0,192
Śniardwy	0,222	0,092	0,077	0,107	0,063	0,253
Beldany	0,292	0,187	0,072	0,115	0,045	0,203

	Biomasa fitoplanktonu (mg/l)						
	Maj		Lipiec		Sierpień		Wrzesień
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011
Mamry	0,82	1,06	0,77	1,90	2,01	0,84	2,23
Kisajno	2,71	0,87	3,74	1,72	3,49	1,59	0,42
Niegocin	0,32	0,31	2,19	1,26	3,39	4,12	0,48
Tałtowisko	0,98	0,34	5,18	4,86	5,80	2,76	1,41
Tały	1,75	0,93	5,18	8,62	6,91	2,19	5,99
Mikołajskie	2,82	3,63	2,94	4,01	10,72	3,45	3,11
Śniardwy	9,88	1,80	4,42	4,46	4,59	2,69	3,09
Beldany	0,95	2,73	7,10	3,66	6,21	3,08	1,60

	Fosfor całkowity TP ($\mu\text{M/l}$)									
	Maj		Lipiec			Sierpień			Wrzesień	
	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2013
Mamry	0,457	0,752	0,629	0,605	0,842	0,590	0,590	0,942	0,630	1,108
Kisajno	0,626	1,080	0,785	0,625	0,963	0,880	0,673	0,988	0,701	1,009
Niegocin	0,913	1,852	0,984	0,817	1,154	1,432	1,228	1,228	1,263	2,247
Tałtowisko	1,369	2,018	1,017	0,966	1,223	0,690	0,808	1,048	0,634	1,034
Tały	1,037	2,653	0,961	1,393	1,365	0,861	0,957	1,318	0,753	1,478
Mikołajskie	0,997	2,967	0,852	1,032	1,461	1,251	1,103	1,535	0,816	1,972
Śniardwy	0,812	1,053	1,365	1,219	1,390	1,188	1,351	0,977	1,144	1,598
Beldany	1,354	2,011	1,002	1,234	1,390	0,861	1,136	1,408	0,876	1,658

	Azot całkowity TN ($\mu\text{M/l}$)									
	Maj			Lipiec		Sierpień			Wrzesień	
	2011	2012	2013	2011	2012	2011	2012	2013	2011	2013
Mamry	54,52	39,55	50,69	43,61	40,08	36,31	57,31	59,03	70,99	59,19
Kisajno	82,61	35,90	58,96	48,43	46,98	41,29	53,94	56,19	63,68	58,72
Niegocin	84,99	52,78	72,07	71,93	60,62	58,59	62,07	72,86	68,80	69,59
Tałtowisko	81,56	69,03	93,57	77,15	73,09	57,08	67,93	69,98	73,85	55,37
Tały	80,81	59,40	71,71	74,72	76,46	61,14	69,67	77,14	76,11	71,43
Mikołajskie	66,48	51,39	71,50	46,17	53,48	55,92	54,64	69,99	74,20	68,61
Śniardwy	63,05	41,99	63,38	78,03	52,43	51,56	69,73	53,92	75,76	67,04
Beldany	49,82	47,73	61,95	46,40	57,19	41,99	50,46	58,98	62,18	67,81

	Węgiel organiczny rozpuszczony DOC (mg C/l)	
	Lipiec	Wrzesień
	2011	2013
Mamry	9,253	9,233
Kisajno	9,937	9,915
Niegocin	10,777	11,100
Tałtowisko	13,033	12,070
Tały	11,930	11,360
Mikołajskie	10,393	9,549
Śniardwy	9,488	9,364
Beldany	9,741	8,843

	Widzialność krążka Secchi'ego SD (m)										
	Maj			Lipiec			Sierpień			Wrzesień	
	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2013
Mamry	2,7	3,3	3,1	3,2	1,8	3,1	3,5	3,2	1,3	2,8	2,4
Kisajno	3,3	3,7	2,9	3,1	3,2	3,1	2,7	2,2	2,4	3,1	3,1
Niegocin	1,9	2,8	1,5	2,0	1,2	1,8	2,1	2,0	1,7	2,6	2,1
Tałtowisko	1,4	2,4	1,6	1,4	1,9	1,7	2,0	1,6	1,7	2,6	2,7
Tały	1,5	1,8	1,5	1,6	1,4	1,1	1,7	1,5	1,3	1,8	2,0
Mikołajskie	1,4	1,4	1,6	2,3	1,5	1,5	1,5	1,4	1,1	2,0	1,6
Śniardwy	1,9	2,0	1,9	1,6	1,5	2,5	1,8	1,4	2,3	1,5	1,6
Beldany	1,6	1,3	1,7	2,4	1,2	1,6	2,1	1,5	1,2	1,8	1,7

	Stężenie tlenu O ₂ na głęb. 1m (mg/l)							
	Maj		Lipiec			Sierpień		Wrzesień
	2012	2013	2011	2012	2013	2012	2013	2011
Mamry	12,29	13,91	10,31	11,28	10,76	11,59	10,97	10,60
Kisajno	11,11	14,15	10,51	10,70	10,29	11,45	10,35	9,88
Niegocin	11,98	16,73	10,69	11,48	10,42	12,92	11,03	10,44
Tałtowisko	11,60	16,11	11,41	12,21	11,19	12,87	10,18	9,58
Tały	13,62	15,94	10,40	13,47	12,07	10,80	10,54	9,58
Mikołajskie	12,90	16,03	9,42	11,78	8,57	11,99	11,86	10,35
Śniardwy	11,86	14,11	9,77	11,97	9,47	12,31	10,59	10,48
Beldany	14,03	16,23	9,50	11,75	9,82	13,26	11,22	10,90

	pH							
	Maj		Lipiec			Sierpień		Wrzesień
	2012	2013	2011	2012	2013	2012	2013	2011
Mamry	7,91	8,04	8,36	7,99	8,34	7,97	7,94	7,87
Kisajno	7,81	8,12	8,39	8,15	8,28	7,98	7,90	7,73
Niegocin	7,98	8,13	8,43	8,28	8,21	8,09	7,98	7,83
Tałtowisko	7,96	8,21	8,48	8,01	8,32	8,07	7,99	7,72
Tały	8,18	8,11	8,56	8,28	8,40	8,14	8,02	7,72
Mikołajskie	8,16	8,22	8,05	8,00	8,05	8,28	8,23	7,83
Śniardwy	7,88	8,07	8,46	8,05	8,21	8,32	8,02	7,98
Beldany	8,20	8,32	8,26	8,02	8,28	8,41	8,14	7,87

	Przewodnictwo (μSi/cm2)							
	Maj		Lipiec			Sierpień		Wrzesień
	2012	2013	2011	2012	2013	2012	2013	2011
Mamry	286	256	349	307	290	282	277	347
Kisajno	293	264	370	317	310	298	298	370
Niegocin	356	316	430	378	352	349	335	434
Tałtowisko	379	338	440	378	369	356	348	446
Tały	342	305	427	346	356	334	332	372
Mikołajskie	312	302	392	325	334	316	318	342
Śniardwy	308	280	376	316	319	300	313	312
Beldany	310	275	376	298	317	299	300	329

Załącznik 2. Sekwencje uzyskane w analizie DGGE-ITS

5a_KF207559

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTAA
TCCATTTAGAAATCGAAGGTAATGAAAATTATCAACAGAACTAAATTGGTCTAACCTAGGTCGGT
CGCAGACTTGAAGTAAAGC

5b_KF207560

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTAA
TCCATTTAGAATTTCCAGAGCAATGAAAATTGCTAATAGAGCCTAAATTGGTCTAACCTAGGTCGG
TCGCAGAC

5c_KF207561

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTAA
TCCATTTAGAATTTGAGAGCAATGAAAATTGCTAATAGAGCCTAAATTGGTCTAACCTAGGTCGG
TCGCAGACTTGAAGTAAAGC

5d_KF207562

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCTTTTGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTAA
TCCATTTAGAACTTCGAGAGCAATGAAAATTGCTAATAGAGCCTAAATTGGTCTAACCTAGGTCGG
TCGCAGAC

5e_KF207563

TCACSCCCGAAGTCGTTACCTCAACCGYAAGGAGGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACCT
AATTCGGGTAKAAGACGAAAAAATAGTAGTCGAAACCAAGAATCAATCCCCAAAAGGTCGGAACG
AGGTATGTGGC

5f_KF207564

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCTCAACCGTAAGGAGGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACCTA
ATTCGGGTATAAGACGAAAAAAGAGTAGTCGAAACCAAGAATCAATCCCCAAAAGGTCGGAACGA
GGTATGTGGC

5h_KF207565

ACSCCAAGTYGTTACTMCCACCCGTWAGGGGGGGGGATGCCGAAGGGGGGGGTGGTGAATGAG
GKGAAGTTMTAACAAGGTAACCGTACCGGAACGTGCGGCTGGATCACCTCCTAACAGGGAWACA
AAAACCGGCTTTGACGTCTGACTAATTTAATGTTAGACCGAAGTCCTGTCATCTCTAAGGTCGATC
GGTACCTCAGTTGATAACTTAAGAGCCTAGTCTGCTTAAGGAGTCAAATCAGTTCCTAACTTTGT
YTAGGTCMCCCCCGCGGGGTTGTCCCGAGA

5i

GTTTARAAAAYGAAAGKTGATGATCAGCAMCGCAAACCTTACATCTGCGCTCTGAGATGAACCCTG
AGGTACCGATCGACCTAMAGATTAMAGGAWCATGGACTGACGATAAAAATAGRCAAACATCACA
ATCAGGYTTTGTCTCCCTGTTAGGAGGTGATCCAGGCGCMCTMCCSGAA

6e_KF207566

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTACCCTTGATAACTCTGAACCAATTTGAATTAGGAGTATTGAGAGGTCACTCTAGGTCGAACAGG
GTTTTGAGTAGAGTTTCTAGACTATGGTTGAGG

6f_KF207567

GTCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACC GTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGA
CCTACCCTTGATAACTCCGAACCAAAATGAATTAGGAGTATTGAGTGGTCACTMTAGGTCTGAACAG
GTTTTGAGTAGAGTTTCTAGWCTATGGTTGAGG

6g_KF207568

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACC GTTCGCGGAGGAGGACRCCCAAGGTAGGGAKGATGAYKG
GGAAGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGCAAGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTCCCACTCAAKGAATTCAACATAAACAAA ACTAKCGATAGTGGAGTCAAACAATAGGTTTCAGAR
TTTGTCATTC

6k

TCGACCTAAGGTGACTCCTTTAACCCCTGCTATAAACTACAGGTCCGTAAAGGGTAGGTCTCCCT
AAAAGGAGGTGATCCAGCCACACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATCA
GCCCTGCCTTCGGCGCCCTCCTCCCTAARGTTARAGWAACRACTTCGGGCGTGA

6l_KF207569

TTAGGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAC
CGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTACTATTAACGGACCTGTAAATTTATAG
CAGGGGGTTAAGGAGTCACCTTAGGTCTGGGGGAATTTGGGTGATGTTTCTAGACTAGGTTAAGGTG
AGCGGGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAR

7b_KF207570

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACC GTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTACCCTTGATAACTCCGAACCAAAATGGATAAGGAGTATTGAGTGGTCACTCTAGGTCTGAACAGG
GTTTTGAGTAGAGTTTCTAGACTATGGTTGAGG

7c_KF207571

CAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACC
TCCTTTTAGGGAGACCTACCCTTGATAACTCCGAACCAAAATGGATAAGGAGTATTGAGTGGTCAC
TCTAGGTCTGAACAGGGTTTTGAGTAGAGTTTCTAGACTATGGTTGAGGTTTGTTTTTTAGTCTTACG
GGATTAA

7e_KF207572

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCCGAAAGGGAGGAGGGTGCCGAAGGCGGGGTTGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTACTTTTGATGAGAGTGCCAAATCCAAAACAACAGCACCTCAAAAGTCATCCAGGTCTGTGCTA
GAAAAGAAAGAGAMTTTCAAAAAC

7f_KF207573

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTGTGGAGGAGGATGTCGAAGGTGGGGSTGAYGMSKGG
GGKGCSTCGTGACAACGTASCYGTACCCGAAGGTGCGGCTGGATCCCCCTCGTAACAGGGAAACA
ACAGSTGAAGTCAAACAAGGTACTTTATTCTCAGGGCATGATCCTGTCTCATCTCGAAGAGGGATCCC
TCCTCAAATGCAAGTCCAGAATCCCAAACAMCAGCACCTCAAAAGTCAGATTCA

7h_KF207574

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTGTGGAGGAGGATGTCGAAGGTGGGGSTGATGGGGGG
GGTGAAGTCGTAACAATGTAGCCGTCCCGGAAGGRGGGAGGGATCACCTCCTTRACAKGGAGACA
AAACSAGATTGTAACAAGGTARCTTTTATGGGGAGGCCAYGATCCTGTCTATMTTTTAGTCGATCG
GTACCTRAGGGTAGATGGTCAGAGCGAAGATGAACGCCTTCAAAAGG

8b_KF207575

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACC GTTCGCGGAGGAGGACGCCGAAGGTAGGGCTGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTACCCACTCAATGAATTAAACATAAACAAAGCTAGCGATAGTGGAGTTTATCAATAAGTTCAGAG
TTGGTCATTCCCAAGGTC

8d_KF207576

TCRSGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTGYYGAGGAGGATGTCGAAGGTGGGGSTGATGRSTGGG
GTGGAGTSGTAMCRAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGMGGCTGGATCACCTCCGACAGGGAGGCAAT
ACGGGATCGTGATGGGGAGACTGTATCTCAGGCCAGGTCGGTCATYTCGAAGGMGATAGGTACCT
CAATTTCAARCGTTAGATGAGCACCTCAAASATTGGCCCATCATGYTGAGAGTCGCTCTTTATTCMT
AAACGTGTGTAGGC

8e_KF207577

AGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATC
ACCTCCTAACAGGGAGACAAAACCTGATTGTGATGTCTGACTATTTTTATCGTCAGGCCATGATCCT
GTCATCTCTAGGTCGATCGGTACCTCAGGGTTGATGGTCAGAGCGCAGATGTAAGTTTTCGTTGCT
GATCATTCAACTTTCAGTTTCTAAACGTTGTCTAGGTCACCCCAAGCGG

9a_KF207578

TRTCCACCCGAAAGGGGGGGGTCACCGAAGACGAGGGGGATGACTGAGGCGAAGTYGTAACAA
GGTAGCAATTCGTAAAAAGGTGGCTGGATCACAACCTTTTAGGGAGTCCCCCGATAAAGGAAGA
GAGGAKGAATAAAGAAGAAAATAAAAAACAATTCAAATAAAGAATCAATCCCAAATCAAGGAA
CGATCTAT

9b

TCTAACCTCGCTGACCTCGGGATTGACGATGGGGTGAAGAATTGATTTTGAAKTGTTTAAKACTCT
CGTCTTTATTCCTCTCTCTTCMTCCATCCGTGGGACTCCCTAAAAGGAGGTGATCCAGCCACACCG
TCACGTACTGCTACCTTGTTACSACTTCACCCCAGTCATCA

9c

GTCTTGTGTGAACCCAGAACCTAGTTTGAAAGCCACATACCTCGTTCCGACCTTTTGGGATTGATTC
TTGGTTTCGACTACTMTTTTTTCGTCTTATACCCGAATTAGGTCTCCCTTTAAGGAGGTGATCCAGC
CACACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGT

9e_KF207579

GGAAGTCGTTGCTCCTACCCTTGTCSTTGAGGATGTSGAAGGTGGGGGTGGGGMTTATGGTGAAGT
YGTAGCAGTGTCAAGGTACCGGRAGGTGCGGGTGCGTCTCCTCCTCCAGGGACAGGGGCACAAC
TRMTGATYTTGAAGTCCGTGAATTTTCATTMTCCGGTCATGTCCTTGTATCTCGTCGSTCCACCGCR
CTTCAATTTCAAGATCAGCAGCTCYTGAGCGATCATGTCWTGMYTG

9f_KF207580

TCACACCCGAAGTTGTTACTCCAACCCTTGTTGGAGGAGGATGTYGAAGGTGGGGMTGATGACTGG
GGTGAAGTAGTGTAAGGTASCSGTACCTGAAGGTGCGGCTGGATCTCCTCSTAACAGGGAGACAA
CAAMTGATTTTGATGTMTGAGGRTTTTATTMTACAGSCCATGATCCTGTCATCTYGAAGSTCYATAG
GTACCTCAATTTCAAGCCCAGTAGCGCCTGAKCGAACAGGTTGRGAYTGAGATSG

11b_KF207581

TCACGSCSGAAGTSGTTGGTCCAACCGMAAGTAGTTGGTTTYATAATTTAGGATRASGTTGGTGGG
AAAGTSGTAATAAMGTAGCTGTTGAATAATGTGAATGTTGATCTCCTCGTTTTAGGGAGACCCAAA
TCAAGTTTTAAGGCAAAAKTCAAAAGTCAAAAATCAAGATCTAGAAAAAAAASCTASATTTAAATT
TAT

11c_KF207582

TCACGCCCCAAGTCGTTACTCTAACCCTTTCGGGGGAGGAGGGTGCCGAAGGCGGGGTTGATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGA
CCTACTTTTGATGAGAGTGCCAAATCCAACAAAAATAGCACCATCAAAAGTCATCCCAGGTCGTGC
TAGGAAAGAAAGAGACA

11d

TGACTCCTTTAACCCCCTGSTATAAACTACAGGTCCGTTAAGGGTAGGTCTCCCTAAAAGGAGGT
GATCCAGCCACACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATCAGCCCTGCCTTC
GGCGCCCTCCTCCCTAAGGTTAGAGTAACGACTTCGGGCGTGA

12a

CRACCTAAGGTGACTCCTTYAACCCCCTGSTATAAACTACAGGTCCGTTRAGAGTAGGTCTCCCTA
AAAGGAGGTGATCCAGCCACACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACRACTTCACCCAGTCATCAG
CCCTGCCTTCGGSGCCCTCCTCCCTAAGGTTARAGTAACGACTTSGGGSGTGA

13b_KF207583

GAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA
GGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACCTAATTCAGGTAGAAGACGAAAAAATAGTAGTC
CATACCAAGAATCAATCCCAAAAGGTCGGAACGAGGTATGTGGCTTTCAAAGTGGTTCTGGGTTCC
ACAAAAGACCTGAATCAGGAACAAGGGCTATT

13c_KF207584

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTGTGGAGGAGGATGTYGAAGGTGGGGCTGATGGGGCC
GGTGGGGGGCMAMGGGGGGACMCGTCCGAAGACGTTAATRTAACCTTAGGGAGGAGGGCGCGAA
GGCAGGGATGAKGAWGGGGTGAAGTSGTATCAAGGTACCATTACCGGAAGTTGTGAAGGATCACC
TCCTTTTAAGGACCAGACTTAGACCGCACCTGTAATTTGGAACAGGGGGTSAAAGAGTCACCTTAG
GTTGA

14a_KF207585

CTSTAWCCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGATGATGACTGGGGTGAAGTSGTAWCAA
GGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGTTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTACCCTTGATAACTCSG
AACCAAAATGAATTAGGAGTATTGAGTGGTCACTATAGGTMGTACAGGGTTTTGAGTWGAGTTTT
AGTCTATGGTTGAGG

14b_KF207586

CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTTAGGGA
GACCTACCCACTCAATGAATTAAACATAAAACAAAGCTAGCGATAGTGGAGTTTATCAATAAGTTCA
GAGTTGGTCATTCCCAAGGTCGTTTCGGATATTTGTGTTGGCTTCCAAGCTATAAGGTTTCGGTTCATG
GGCTATTAGCTCAGGTGG

14c_KF207587

TAACCTTAGGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGRSTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGC
CGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTACCCTTAACGGACCTGTAGTTT
TATAGCAGGGGGTTAAAGGAGTCACCTTAGGTCGAGGGAATTCTGGTTAAKTTTCTARACTAGGTT
AAGGTGA

15a

SGTGACTCCTTCACCCCCTGCTATAAACTACAGGTCCGTTGAGAGTAGGTCTCCCTAAAAGGAGG
TGATCCAGCCACACCTTCCGGTACKGCTACCTTGTTACSACTTCACCCAKTCATCARCCCTGCCTT
CGSGGCCCTCCTCCCTAASGTTATAGTAACKACTTCKGGCGTGA

16a_KF207588

GGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGA
AGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTAATCCATTTAGAAATGTTAAGGAAATTACCA
TAACAACCTAAATTGGTCTAACCTAGGTCGGTCGCAGACTTGAAGTAAGTCTTTCAAACCTATGATT
TGGTTCGATAAGGGCTATTAG

16b_KF207589

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGAMTGATGAYTGGG
GTGAAGTSGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTA
ATCCATTTAGAACTTGAAAGCAATGAAAATTGCTAATASAGACTWAACTGKTSTAACCTAGGTCGG
TSGCAGACTG

16d_KF207590

TCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCGMAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGATGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCCA
AATCAAGTCAAAAGGCAAAAGTCAAAAGTCAAAAATCAAGACCTAGACAAAAAACCTAGACTTCG
GTTTATCCCAAGGTCGGTCGC

16e_KF207591

CACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCCTTTCGGGGGAGGAGGGTGCCGAAGGCGGGGTTGATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGA
CCTACTTTTGAGTAGAGTGCCAAATCCAACAAAATAGCACCATCAAAAGTCATCCCAGGTCGTGC
TAGGAAAGAAAGAGAC

16f

CTCTTTCTTTCCTAGCACGACCTGGGATGACTTTTGATGGTGCTATTTTTGTTGGATTGCGCACTCTC
ATCAAAAGTAGGTCTCCCTAAAAGGAGGTGATCCAGCCACACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTAC
GACTTCACCCAGTCATCAACCCCGCCTTCGGCACCTCCTCCCCGAAAGGGTTAGAGTAACGAC
TTCGGGCGTGA

16g

CTTAACCTAGTCTAGAACTTAACCAGAATTCCTCGACCTAAGGTGACTCCTTTAACCCCTGCTA
TAAACTACAGGTCCGTAAAGGGTAGGTCTCCCTAAAAGGAGGTGATCCAGCCACACCTTCCGGTA
CGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCAGCCCTGC

16h_KF207592

TCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCCGAAAGGGAGGAGGGTGCCGAAGGCGGGGTTGATGACTG
GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGAC
CTACTTTTGATGAGAGTGCCAAATCCAACAAACAGCACCTCAAAAGTCATCCCAGGTCGTGCTA
GGAAAGAAAGAGACTTCAAA

Załącznik 3. Sekwencje uzyskane w analizie DGGE-*mcyA*

8b2011_KF207595

CAAACAGATGTACTGACAGGTTTAGTGTCTAATGGCCGATTGGAAGAACTGATGGGGAAAGGGT
TTTAGGGCTTTTTCTCAATACTTTGCCTCTGCGGTTACAGCTAACGGGTGGAACCTGGTTAGACTTA
GTACGACAAGTTTTTGCACGGAACGGGATAGTCTGGCCTGGCGACGTTATCCCTTAGCGGAGTTA
CAAAAAAGATTGGGTGGTCAACCGTTA

9a2011_KF207596

GGTCTCTAATGGACGGTTAGAAGTAGCCGATGGGGAAAAGATATTAGGTTTATTTTTGAATACTTT
GCCCCACGTTTAGAGTTATCTGGAGGTTCTTGGAGCGATTAGTTAAGCAAGCTTTTGATGTTGAA
AGAGAATGCTTATCTTGGCRAARATATCCCCTGGCTGAGTTACAAAAAATTTTGCGGGTCAACCT
TTG

9b2011_KF207597

GTCTCTAATGGACGGTTAGAAGCAGCCGATGGGGAAAAGATATTAGGTTTATTTTTGAATACTTTG
CCCCTACGTTTAGAGTTATCTGGAGGCCCTTGGAGCGATTAGTTAAGCAAGCTTTTGATGTTGAAA
GAGAATGCTTATCTTGGCGAARATATCCCCTCGCTGAGTTACAAAAATCAGGTCAACCTTTGTTTG
ATACGGCTTTT

5c2012_KX272757

GGCTTAGTGTCTATGSCTWATTGKAARAACTCATCGGTAAAGGGTTTTAGGGYTTTTTCTCATACT
TTGCCTCTGCTTTACGCTAACGGGTGGAACCTGCTTTKACTTATTACTACAAGTTTTGCAACGGAC
GGGATASTCTGGCCTGTCTACTTTATCCCTTACGKATTYCMAAAAA

7a2012_KX272758

ATTGWAARAACTGATGGAAAGAGGGTTTTAGGGCTTTTTCTCAATACTTTGCCTCTGCKGTTACA
GCTAACGGGTGGAACCTGGTTAGACTTATTACRACWAGTTTTTGCAACGRAACGGGATAGTCTGGC
CTGCTYACMTTATCCCTTACGRAGTTACAAAAAAGATTGGGTGGTCAACCGTTATTTGATACGGTT
TTTAWTTTT

18a2012

TRCGCSTTTKKTCTCTATKGGAMGRTTAAACAKCCGATTTGAAAACCTATAGGTTTTTTTTGAATACTT
TGCCCCTCTTTAGACTATCTGAAGGCCCTTGKAGCGTTASTTAWCAAGCTTTSGATTTAAARAAA
TGCTTACCT

19a2012_KX272759

GAGGGAKTTGTTACGGGGTTTAGTCTCTAATGGACGGTTAGAAGCAGCCCATGGTTGAAAAGATAT
TAGGTTTATTTTTGAATACTTTGCCCTACGTTTAGAGTTATCTGGAGGCCCTTGGAGCGATTTAGT
TAAGCAAGCTTTTGATGTTGAAAGAGAATGCTATCTTGGCSAAAATATCCCCTCGCTGATTACA
AAAATCAGGTCAMCCTTTGTTTGATACGGCTTTTAATTTT

24a2012_KX272761

CAGATGTACTGMACAGGTTTAGTGTCTAATGGCCRATTGGAARAACTGCTGTGGAAAGGGTTTTA
GGGCTTTTTCTCMTACTTTGCCTCTGCGGTTACAGCTAACGGGKGGAAACCTGGTTAGCCTTAGWAC
GACAAGTTTTTGMMCGGAACGGGATAGTCTGGCCTGGCGACGTTATCCCTTAGCGGAGTTACAA
AAAAGATTGGGTGGTCAACCGTTATTTGATACGGTTTTTAAT

24b2012_KX272762

GAGGTACTGGCAGGTTTAATGTCTTTGGCCWATTGGAARAACCCACGGTAAAGGGTTTAGGGTTTT
TCCATACTTTGCCTCTGCGTACAGCTAMCGGKGGACCTGTTAGACTTARTACMACAAGTTTTTG
AACGGYWCGGATATTCTGGCCTGSCAACATTATTCCTTA

Załącznik 4. Sekwencje *mcyA*, *mcyD* i *mcyE* szczepu *Synechococcus* sp. BE0807B*mcyA*

TTGTAACTCCGCTAAGGGATAACGTCGCCAGGCCAGACTATCCCGTTCCGTTGCAAAAACCTTGTCG
TACTAAGTCTAACCAGGTTCCACCCGTTAGCTGTAACCGCAGAGGCAAAGTATTGAGAAAAAGCCC
TWAAACCCTTTCCCCATCAGTTTCTTCCAATCGGCCATTAGACACTAAACCWGTYAG

mcyD_KC341755

ACCTTTAGTTATTGGTTCTGTCAAAACAAATTTAGGACACTTAGAAGGAGCAGCAGGAATTGCCGG
ATTAATTAACACAGTTTTAGCTTTACAACACCATAAAATTCCTCCCCATCTTCACTTTAAAAAACCC
AACCCCTCGGTTTGATTGGAGTTCTAATATTTTTGAAGTTCCTGTAGGCGGAAAAACCTGGAATCCTA
GTGAACGCCAAAGAATTGCCGGGGTAAGTTCCTTTGGTTTTAGTGAACAAATGCTCATATTATTG
TCGGAGAAATTGACTCTAGTTTACCTCAAAAATCTGAGCCTAACTTTTACCTATTACCGCTTTTCGGC
TCGTTCTGAAAAATCTCTCCAAGAGTTAACTAAAAATATCAAGACGCTTTGAATGGGTCTGTAA
TTTTGCTGATGTTTGTGTTTACAGCTACTACAGGACGGGCTATTTTTCAGCATCGACTATGTATTTTAG
CTGAATCAATGACAACAGCACAAGCAGCACTGGTTAGTTTCCAAAAAGGTGAAAATTCTCAACAA
TTAATTACACCAATTTTATCAGAAAAACAAGCTAAAAATAGCTTTTCTATTTTCAGGACAAGGCTCA
CAATATTCAGGAATGGGAGAAACCTTTATCACCGAGAACCTGTCTTTAAAAATACTTTAGATATT
TGTAATGAAATCCTAGAACCTATTTTAGAAAAATCCCTGTTAGATTAAATCTTTAAATTGCCCAATA
GCCAGCTATTAGAACAGACTCAAATCACCCAGCCCGTGCTATTTT

mcyE_KC341756

TTAAACCTGGCTTTTTTGATCAGAAAAACAACGATGTTTAGAACCGGGGATTTAGGGAAACAACTG
CTCCCGGTGTGATTGAATTTATGGGCAGAAAAGACAATCAAGTTAAGGTAAATGGCTATCGTATCG
ACCCCGAAGAAATTGAATATCAACTTAATCGTTATCCTCAGATTGAGAGAGCTATTATTCTACCGA
TATCAGTCAATAATCAAACCTCAATTATCAGCCTATTGTCAAACAGATAAACAGATAGAAATTTCCG
AAATTAGAGAATTTTGTAGCTAATTTTCTGCCAGTTTACATGATTCCTAGTTACTTTATTTTCTTAAAG
CAATTTCCCCTAACTAAACACGGCAAACCTTGACTTAAACTCAATGATTGCACTCAATGAAACCGGG
AAATCTACCCAAGTAAATTATGTTGCACCGCGTAATAATTTAGAGTCAAACCTAGTTAGAATCTGG
GAAAAGATTCTAACCAAACATCCCATCGGTATTTTTGATAACTTCTTTGAAATTGGCGGACATTCTC
TGATGCTTTTCGAGAATCGTAACCCACGTTTCATAAAGAATTAAATGTATCGGTAATAATTGGCTGACT
TCTTTAAAGTTCCTACCATTTGCCGGATTAGCCGTTTTAGTCTCTAAAACCTGAATATGATTATCAAGA
ACCCATCCCCACA

Załącznik 5. Sekwencje genów *mlr* z próbek wody i osadów z jezior mazurskich*mlrA_A1*

ATTATTACCGCTGTCAGGTCCACGTTTCGAGTATCCGGGAGCCTATACGCTTTTGTCTGTTTCCGGCCG
 CCCAATGTTTCGCGGCTCTGATCGTAACCGGTATCGGCTATGGGCGCGCAGGATTTTCGTGAACTGC
 TCAGTCGCTGCGCCCCGTGGCGATCGCCTGTTTCTGGCGTCAGGGCGTTACTGTCATAGCCGTGTG
 TTTCTTGCCTTCTTCGCGCTCACAGGAATTATGTGGGTTTCAGACATACCTCTACGCTCCGCCTGGT
 ACGCTTGATCGCACCTTCTGCGCTATGGGTCAGATCCGGTCGCCATTTATGCGATGCTGGCAGCAT
 CGCTGCTACTCAGCCCTGGCCCGCTGCTCGAAGAACTGGGCTGGCGCGGCTTTGCGCTGCCGCAGC
 TCCTGAAGAAGTTTGACCCCTGACCGCAGCGGTGATCCTCGGCATAATGTGGTGGGCTTGGCATT
 TGCCGCGCGACCTGCCGACACTGTTCTCCGGCGATCCTGGCGCGGCTGGGGCGTTATTGTCAAGC
 AATTCGTTATCGTCCGGGGTTCATTGCCGGCACCATCATCGCTGTCTTCGTATGCAACAAGCTCGG
 TGGATCGATGTGGGGTGGCGTGCTCATTACGCGATCCATAACGAAGTGGGCGTAAACGTCACCTGC
 CGAATGGGCCCCAACGGTTGCAGGGCTCGGGTGGCGCCCTTGGGATTTTCATCGAAT

mlrB_B1

GTACAAGGGGTCGCGATAATAGCCATCAGGCGCGGAGCGCAGGTCGCCAACTTTTCCGAGGCGTTT
 CATTTCCGGCAGGATCAATTGCGCGATCAAAAGCGGGATCAGGCGCCTCGGGCTTCACGAGCAAAG
 CAATTTTGC GCGCACGCTCAGCTGGCGCGATATCGTCGCGATTACACATCAGCTGATACCGATCC
 CGCTGTCCGGATACATTACGTCCATGGCGCGATTGCCACAACCAAGCCGAATGCGACACAACAC
 GCTCGCTTTGCCGATCATCCACGAACAACCCACCGGCATAATCGACAGGTCTACCAGAACGCAGTT
 TCCCGTTTCGCGAGGCGCGCCACTTCGAGTGCCTGACCGCCGGTTCGCCGCGAGCGATGCACCATG
 CCAAGAGCAAGATCG

mlrB_B2

CGATCTTGCTCTTTGGCATGGTGCATCGCTCGCGGCGACAACCGGCGGTTCAGGCACTCGAAGTGGC
 GCGCCTCGCGAACGGGAACTGCGTTCTGGTAGACCTGTGCGATTATGCCGGTGGGTTGTTTCGTGGA
 TGATCGGCAAAGCGAGCGTGTGTGTGCGATTTCGGGCTTGGTTGTGGGCAATCGCGCCATGGACGT
 AATGTATCCGGACAGCGGGATCGGTATCAGCGTGATGTGTAATCGCGACGATATCGCGCCAGCTGA
 GCGTGC GCGCAAAATTGCTTTGCTCGTGAAGCCCGAGGCGCCTGATCCCGCTTTTGATCGCGCAAT
 TGATCCTGCCGAAATGAAAAGCCTCGGAAAAGTTGGCGACCTGCGCTCCGCGCCTGATGGCTATTA
 TCGCGACCCCTTGATC

mlrB_B3

TGCATCGCTCGCGGCGACAACCGGCGGTTCAGGCACTCGAAGTGGCGCGCCTCGCGAACGGGAAAC
 TCGGTTCTGGTAGACCTGTGCGATTATGCCGGTGGGTTGTTTCGTGGATGATCGGCAAAGCGAGCGTG
 TTGTGTGCGATTTCGGGCTTGGTTGTGGGCAATCGCGCCATGGACGTAATGTATCCGGACAGCGGGA
 TCGGTATCAGCGTGATGTGTAATCGCGACGATATCGCGCCAGCTGAGCGTGCGCGCAAAATTGCTT
 TGCTCGTGAAGCCCGAGGCGCCTGATCCCGCTTTTGATCGCGCAATTGATCCTGCCGAAATGAAAA
 GCCTCGGAAAAGTTGGCGACCTGCGCTCCGCGCCTGATGGCTAT

mlrB_B4

GCATCKCTCGCGGCGACAACCGGCGGTTCAGGCACTCGAAGTGGCGCGCCTCGCGAACGGGAAACT
 GCGTTCTGGTAGACCTGTGCGATTATGCCGGTGGGTTGTTTCGTGGATGATCGGCAAAGCGAGCGTGT
 TGTGTGCGATTTCGGGCTTGGTTGTGGGCAATCGCGCCATGGACGTMATGTWTCGGACAGCGGSA
 TSGGTATCAGCGTGATGTGTAATCGCGACGACATCGCGCCRGCTGARGKGC GCGCAAAATTGCTT
 TGCTCGTGAAGCCCGAGGCGCCTGATCCCGCTTTTGATCGCGCAATTGATCCTGCCGAAATGAAAA
 GCCTCGGAAAAGTTGGCGACCTGCGCTCCGCGCCTGATGGCTATTATCGCGACCCCTTGATC

mlrC_C1

TAGCGCTTTTCGGCAGGCTCGACACCGACCGCCCGGAACATCTCGGGGCCATAGCACTGGTCGCGA
ATTCGCTAACGATGATGTCGAGTCCGGCAGCACTGATGCAAACGACGCGCCCCAGAGGCGGCCG
AGAGCCTAGAAGGTTTTGCGTGACGTTTTCGGCAAGCCCTGTGATTTTGCCGCGAACGTCGAGGGG
CGGCCCGGATGCCTCGCCGACCTTGCCGCCAACGCGAAGCGAAAAATCGGCACCAAGGCCCGCTT
CAAATCCCAAACGTACTGCGAGGGGATCCCATATCGGACCAATGCATGCGGGGGTAAGTCCATTGT
CCAACATTGCTCGAGCCAATGCCATATTGTCACCGGAAGCCCCCTCCGCCGGGGTTGTCGGAACAT
CGACCAGAATTACGGGAAATGCGGTGCGAGCCTTGGCAAGCTCGATGTCATCCGCAAAGGTTCCGCC
CTGTCCCATTGCCTTTTCATGACCCCGGCCATGGCTTGATAGCGTCGACCGAAGTCTTGCGCGATCGA
CGCAGCGGCTGGCTGGTCATTATTGGTATATATCAGCACTTTCGACCCCATTCGCGCTACATCACCG
GCGCGGA

mlrC_C2

GGGGCCATAGCACTGGTCGCGAATTTTCGCTAACGATGATGTCGAGTCCGGCAGCACTGATGCAAAC
GACGCGCCCCAGAGGCGGCCGAGAGCCTAGAAGGTTTTGCGTGACGTTTTCGGCAAGCCCTGTGAT
TTTGCCGCGAACGTCGAGGGGCGGCCCGGATGCCTCGCCGACCTTGCCGCCAACGCGAAGCGAAA
AATCGGCACCAAGGCCCGCTTCAAATCCCAAACGTACTGCGAGGGGATCCCATATCGGACCAATG
CATGCGGGGGTAAGTCCATTGTCCAACATTGCTCGAGCCAATGCCATATTGTCACCGGAAGCCCCCT
CCGCCGGGGTTGTCGGAACATCGACCAGAATTACGGGAAATGCGGTGCGAGCCTTGGCAAGCTC
GATGTCATCCGCAAAGGTTCCGCTGTCCCATTGCCTTTTCATGACCCCGGCCATGGCTTGATAGCG
TCGACCGAAGTCTTGCGCGATCGACGCGAGCGGTGGTGGTCATTATTGGTATATATCAGCACTTTC
GACCCCATTCGCGCTACATCACCGGCGCGGA

mlrC_C3

TAGCGCTTTTCGGCAGGCTCGACACCGACCGCCCGGAACATCTCGGGGCCATAGCACTGGTCGCGA
ATTCGCTAACGATGATGTCGAGTCCGGCAGCACTGATGCAAACGACGCGCCCCAGAGGCGGCCG
AGAGCCTAGAAGGTTTTGCGTGACGTTTTCGGCAAGCCCTGTGATTTTGCCGCGAACGTCGAGGGG
CGGCCCGGATGCCTCGCCGACCTTGCCGCCAACGCGAAGCGAAAAATCGGCACCAAGGCCCGCTT
CAAATCCCAAACGTACTGCGAGGGGATCCCATATCGGACCAATGCATGCGGGGGTAAGTCCATTGT
CCAACATTGCTCGAGCCAATGCCATATTGTCACCGGAAGCCCCCTCCGCCGGGGTTGTCGGAACAT
CGACCAGAATTACGGGAAATGCGGTGCGAGCCTTGGCAAGCTCGATGTCATCCGCAAAGGTTCCGCC
CTGTCCCATTGCCTTTTCATGACCCCGGCCATGGCTTGATAGCGTCGACCGAAGTCTTGCGCGATCGA
CGCAGCGGCTGGCTGGTCATTATTGGTATATATCAGCACTTTCGACCCCATTCGCGCTACATCACCG
GCGCGGA

mlrC_C4

ACATAGCGCTTTTCGGCAGGCTCGACACCGACCGCCCGGAACATCTCGGGGCCATAGCACTGGTCG
CGAATTTTCGCTAACGATGATGTCGAGTCCGGCAGCACTGATGCAAACGACGCGCCCCAGAGGCGG
CCGAGAGCCTAGAAGGTTTTGCGTGACGTTTTCGGCAAGCCCTGTGATTTTGCCGCGAACGTCGAG
GGGCGGCCCGGATGCCTCGCCGACCTTGCCGCCAACGCGAAGCGAAAAATCGGCACCAAGGCCCG
CTTCAAATCCCAAACGTACTGCGAGGGGATCCCATATCGGACCAATGCATGCGGGGGTAAGTCCAT
TGTCCAAACATTGCTCGAGCCAATGCCATATTGTCACCGGAAGCCCCCTCCGCCGGGGTTGTCGGAAC
TATCGACCAGAATTACGGGAAATGCGGTGCGAGCCTTGGCAAGCTCGATGTCATCCGCAAAGGTTTC
GCCCTGTCCATTGCCTTTTCATGACCCCGGCCATGGCTTGATAGCGTCGACCGAAGTCTTGCGCGAT
CGACGCGAGCGGTGGCTGGTCATTATTGGTATATATCAGCACTTTCGACCCC

mlrD_D1

GATTACGGCCATCAGGACACCGGCCAGAAGCGGGATGACGGACCGGCCGTCGACCCGATCGGGG
CTTCATTGATCGGATGGGAAGCTGCTCCAGGTCGATCGGGTGGCAGCAGATGACGTCCGGCCAAA
AAGATGACGATGGCGGCCGCAAGCCCTGTTGCGGAAGCCAGGAAGCTATAGCGCCAGCCGAAATT
CTCTCCAAGCGTGCCGCAAATCAGCGGTGCAAGCAGCGCTCCGGCGCTGACTGCCAGATAATAGA
AGCTGAAACTGCGTTGGCGATCAGGGTCGTTTGAGAAAAAAGAGCGCCCAGAGTAGCGGGAAGG
GTAGGCAGAAACAGGCCGTTGCCAATGACAATTGCGGCGAGACAGACCGTAACGTTGGCACCAAA
CAAGAGGCCGATATACCCCGCCATCTTCAGCAATGCGCCGCCGATAATTGCCGCGAGAGCGGCCGAT
AAAACGGTCGGCGAGCCACCCCCCAAGATTGGCGTTACATAGGCTACCCCGAGGAACGTCCCGT
AGATAAGCGAGGCGTCTCGGCGGAATAGCCAAGGTCCTGCGTAAGGTAATAGACGAGTACAGTC
C

mlrD_D2

TACGGCCATCAGGACACCGGCCAGAAGCGGGATGACGGACCGGCCCGTCGCACCGATCGGGGCTT
CATTGATCGGATGGGAAGCTGCTCCAGGTCGATCGGGTGGCAGCAGATGACGTCCGGCCAAAAAG
ATGACGATGGCGGCCGCAAGCCCTGTTGCGGAAGCCAGGAAGCTATAGCGCCAGCCGAAATTCTC
TCCAAGCGTGCCGCAAATCAGCGGTGCAAGCAGCGCTCCGGCGCTGACTGCCAGATAATAGAAGC
TGAAACTGCGTTGGCGATCAGGGTCGTTTGGAGAAAAAAGAGCGCCCAGAGTAGCGGGAAGGGTA
GGCAGAAACAGGCCGTTGCCAATGACAATTGCGGCGAGRCAGACCGTAACGTTGGCACCAAACAA
GAGGCCGATATACCCCGCCATCTTCAGCAATGCGCCGCCGATAATTGCCGCAGAGCGGCCGATAA
AACGGTCGGCGAGCCACCCCCCAAGATTGGCGTTACATAGGCTACCCCGAGGAACGTCCCGTAG
ATAARCGAGGCGTCCTCGGCGGAATAGCCAAGGTCCTGCGTAAGGTAATAGACGAGTACAGTCC

mlrD_D3

GATTACGGCCATCAGGACACCGGCCAGAAGCGGGATGACGGACCGGCCCGTCGCACCGATCGGGG
CTTCATTGATCGGATGGGAAGCTGCTCCAGGTCGATCGGGTGGCAGCAGATGACGTCCGGCCAAA
AAGATGACGATGGCGGCCGCAAGCCCTGTTGCGGAAGCCAGGAAGCTATAGCGCCAGCCGAAATT
CTCTCCAAGCGTGCCGCAAATCAGCGGTGCAAGCAGCGCTCCGGCGCTGACTGCCAGATAATAGA
AGCTGAAACTGCGTTGGCGATCAGGGTCGTTTGGAGAAAAAAGAGCGCCCAGAGTAGCGGGAAGG
GTAGGCAGAAACAGGCCGTTGCCAATGACAATTGCGGCGAGACAGACCGTAACGTTGGCACCAA
CAAGAGGCCGATATACCCCGCCATCTTCAGCAATGCGCCGCCGATAATTGCCGCAGAGCGGCCGAT
AAAACGGTCGGCGAGCCACCCCCCAAGATTGGCGTTACATAGGCTACCCCGAGGAACGTCCCGT
AGATAARCGAGGCGTCCTCGGCGGAATAGCCAAGGTCCTGCGTAAGGTAATAGACGAGTACAGTC
C

Podziękowania

Serdecznie dziękuję...

promotorowi prof. dr hab. Ryszardowi Chróstowi za ukierunkowanie mojej pracy, pomoc merytoryczną, cenne rady, a także za ogromną serdeczność i cierpliwość;

promotor pomocniczej dr hab. Iwonie Jasser za wsparcie, życzliwość i owocną współpracę naukową;

dr Michałowi Koprowi z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Wydziału Biologii UW za naukę techniki real-time PCR i pomoc w realizacji ważnej części pracy doktorskiej;

koleżankom i kolegom z Zakładu Ekologii Mikroorganizmów i Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Biologii UW za pomoc w realizacji badań, ciekawe dyskusje i przyjacielską atmosferę w pracy;

rodzinie i bliskim za wsparcie i wiarę w moje możliwości.

* * *

Pracę dedykuję mojemu Tacie